

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra zoologie



Chromosom Y v hybridní zóně myší

DIPLOMOVÁ PRÁCE

autor: **Bc. Pavel Rubík**

vedoucí práce: **Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.**

Praha 2011

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury.

V Praze 29. srpna 2011

Pavel Rubík

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D. za vedení mé práce, zájem, připomínky a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Václavu Janouškovi za ochotu pomoci se zpracováním výsledků. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině, která mě po celou dobu studia neúnavně podporovala.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory grantu GAČR 206/08/0640 Imunogenetické studium hybridní zóny myši domácích.

Abstrakt

Zóna kontaktu mezi poddruhy myši domácí *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* je jednou z nejintenzivněji zkoumaných hybridních zón. Je tomu tak i díky zjištěné rozsáhlé introgresi chromozomu Y poddruhu *M. m. musculus* na genetické pozadí *M. m. domesticus*. Jedna z teorií o vzniku této introgrese jej vysvětluje pomocí intragenomického konfliktu mezi pohlavími. Díky sadě variabilních mikrosatelitových markerů na chromozomu Y jsem zkoumal platnost této teorie jednoduchými přístupy odhalujícími historii introgresní oblasti. Ukázalo se, že příliš velká variabilita našich markerů znemožňuje odhalení platnosti této teorie. Oproti tomu se naše markery ukázaly jako vhodné k použití v analýzách populační struktury myši domácí. Dokážeme díky nim určovat migranty mezi jednotlivými lokalitami i odhadovat míru uzavřenosti populační struktury vůči migrantům z okolí. Populace se v našich analýzách ukázaly jako poměrně uzavřené a odolné vůči přílivu migrantů. Navzdory závěrům z předchozích výzkumů, kdy disperze samců probíhala maximálně do jednoho kilometru, jsem odhalil i poměrně značný počet migrací na vzdálenosti do třiceti kilometrů.

Klíčová slova

Mus musculus musculus, *Mus musculus domesticus*, chromosom Y, introgrese Y chromosomu, populační struktura, migrace, hybridní zóna

Abstract

The contact zone between subspecies of house mouse *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus* is one of the most intensively studied hybrid zones. It is also due to extensive introgression of the Y chromosome of *M. m. musculus* subspecies to the genetic background of *M. m. domesticus*. One theory of the origin of the introgression explains it by intragenomic conflict between the sexes. With a set of variable microsatellite markers on the Y chromosome, I have examined the validity of this theory by simple approaches revealing the history of the introgression area. It turned out that overly big variability of our markers makes the revelation of this theory impossible. Our markers have been found suitable for use in the analysis of population structure of house mouse. Thanks to them, we can identify migrants between localities and estimate the level of closeness of the population structure in relation to migrants from the neighborhood. Populations in our analysis proved to be relatively closed and resistant to the influx of migrants. Despite the conclusions of previous research where the dispersion of males ran up to one kilometer, I have discovered a relatively large number of migrations to a distance of thirty kilometers.

Keywords

Mus musculus musculus, *Mus musculus domesticus*, Y chromosome, introgression of the Y chromosome, population structure, migration, hybrid zone

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled	8
2.1	Hybridní zóna	8
2.1.1	Obecný úvod do teorie hybridních zón	8
2.1.2	Hybridní zóny a speciace	9
2.1.3	Hybridní zóna myši domácí	10
2.1.4	Chromosomy v hybridní zóně myší	13
2.1.5	Introgrese chromosomu Y	14
2.2	Myš jako modelový organismus	17
2.2.1	Sociální struktura myší	17
2.2.2	Disperze u myši domácí	18
3	Cíle práce	20
4	Materiál a metody	21
4.1	Vzorky DNA	21
4.2	Polymerázová řetězová reakce	22
4.3	Fragmentační analýza	24
4.4	Statistické analýzy	24
5	Výsledky	27
6	Diskuze	39
6.1	Mikrosatelitové markery	39
6.2	Pozice hybridní zóny	39
6.3	Analýza sociální struktury	40
6.4	Analýza introgresní oblasti	42
7	Závěr	43
8	Použitá literatura	44
9	Přílohy	49

1 Úvod

Hybridní zóna je oblast, kde se setkávají areály rozšíření dvou druhů a tyto druhy se mezi sebou kříží za vzniku plodného potomstva. Jedincům, vzniklým takovýmto křížením se říká hybridi. Z biologického hlediska se jedná o zajímavý jev, který skýtá celou řadu nevyřešených problémů. Předně hybridi porušují svým vznikem hranice druhu, protože samostatné druhy by se mezi sebou neměly křížit. Když už se ale kříží, tak je otázkou, proč hybridní zóna zůstává jenom na okraji areálů rozšíření a postupně nepřekryje areály výskytu obou druhů? Základní vysvětlení říká, že hybridi mají oproti rodičovským taxonům sníženou fitness. Výskyt hybridní zóny je tak vlastně udržován neustálým doplňováním genetického materiálu obou druhů a selekcí proti hybridům. Takovým zónám se říká tenzní a jejich základní charakterizací je postupné vytrácení se alely typické pro jeden z rodičovských druhů napříč oblastí hybridů. Hybridní zóny jsou jakousi přírodní genetickou laboratoří, kde lze sledovat mechanismy, které způsobují izolaci druhů od ostatních. Jedním z takovýchto izolačních mechanismů je i takzvaná reprodukční bariéra po vzniku zygoty. Většinou platí, že geny způsobující takovou izolaci leží na pohlavních chromosomech. Druhově specifické alely nacházející se na těchto chromosomech tak vykazují velmi rychlé vymizení v centru hybridních zón. Nejinak je tomu i v zóně hybridů dvou poddruhů myši *Mus musculus musculus* a *M. m. domesticus*. Tato zóna se táhne přes celou Evropu od Dánska přes Bavorsko a západní okraj České republiky až na Balkán a do Bulharska a je to jedna z nejstudovanějších hybridních zón na světě. Právě v česko-bavorském transektu této zóny byl zjištěn jediný známý případ porušení onoho ostrého přechodu pohlavního chromosomu Y napříč oblastí hybridů myši domácí. Chromosom Y poddruhu *M. m. musculus* zde proniká zhruba 20 kilometrů na území obývané *M. m. domesticus*. Teoretické vysvětlení tohoto jevu předpokládá intragenomický konflikt mezi pohlavími. Ten by však byl pravděpodobně spojen s rychlou expanzí několika málo typů chromosomu Y do celé oblasti průniku. Tuto rychlou expanzi by tak díky efektu zakladatele mělo provázet i snížení variability samčího chromosomu. Podrobná analýza tohoto typu však doposud v myší hybridní zóně chybí. Analýza založená na výzkumu variabilních lokusů na chromosomu Y by také mohla přispět k odhalení detailů populační struktury a migrace.

2 Literární přehled

2.1 Hybridní zóna

2.1.1 Obecný úvod do teorie hybridních zón

Hybridní zóna je oblast v přírodě, kde dochází k časovému i prostorovému překrývání dvou geneticky odlišitelných populací. Tyto populace se vzájemně kříží a produkují životaschopné a alespoň částečně plodné potomstvo s kombinovaným genotypem (hybridy). Vzniká tak oblast, která často bývá i jenom několik stovek metrů široká, ale na délku může probíhat napříč kontinenty. V takovém pásu je pak množství hybridních jedinců, kteří oddělují obě mateřské populace (Barton a Hewitt 1985; Arnold 1997).

Průběh hybridní zóny můžeme charakterizovat takzvanou klinou, tj. postupnou změnou frekvence určité alely napříč hybridní zónou. Bude-li se příslušná alela vyskytovat v genomu jednoho organismu a v druhém nikoliv, bude frekvence této alely postupně přes hybridní zónu klesat, až vymizí úplně. Vynesení frekvence této alely napříč hybridní zónou pak vytvoří klasickou křivku sigmoidálního tvaru a hovoříme o postupné klině (Barton a Hewitt 1985; Barton a Gale 1993). Čím bude větší selekce na příslušnou alelu, tím bude centrální oblast kliny strmější. Podle toho můžeme pak usuzovat na geny, které způsobují nekompatibilitu genomu hybridů. Na takové geny bude logicky působit největší selekce a klina tak bude nejstrmější, protože jejich pronikání do genomu druhé populace bude omezeno. Řada hybridních zón je mezi druhy ve stádiu zrodu. Pomocí dostatečného počtu molekulárních markerů se známou pozicí v genomu se tak dají vytipovat oblasti chromosomů, ve kterých pravděpodobně leží geny důležité pro vznik nových druhů (Tucker et al. 1992; Barton a Gale 1993; Payseur et al. 2004; Payseur et al. 2005).

Přestože hybridní zóny nejsou úplně běžné, jsou poměrně dobře studované. Vede k tomu fakt, že hybridizace napovídá mnohé o formování reprodukčních bariér, které jsou klíčové pro poznávání vzniku nových druhů. Oproti umělému křížení v laboratoři má pak pozorování hybridizace v přírodních hybridních zónách mnoho výhod. Jedná se především o přirozeně probíhající evoluční procesy, které se dají mnohem snadněji generalizovat (Arnold 1997). Dobře popsané hybridní zóny tak najdeme napříč různými typy organismů, od rostlin po bezobratlé a obratlovce (Boursot et al. 1993; Rieseberg et al. 1999; Riginos a Cunningham 2005).

2.1.2 Hybridní zóny a speciace

Již jenom ze samotné definice hybridních zón je patrné, že jejich existence představuje problém pro samotnou definici druhu, specifikovanou jako "skupina jedinců, kteří se mohou křížit a produkovat plodné potomky a jsou reprodukčně izolováni od jiných takových skupin" (Mayr 1944). V hybridních zónách se totiž často kříží právě populace označované za samostatné druhy, nebo alespoň poddruhy. Příkladem mohou být třeba hybridní zóny poddruhů myši domácí – *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*, či *Mus musculus musculus* a *Mus musculus castaneus* (Boursot et al. 1993). Jedinci vzniklí takovýmito křížením, pak mají sníženou fitness díky vzniku nekompatibilit v hybridním genomu (Coyne a Orr 2004). Můžeme u nich tak v reálném čase sledovat průběh reprodukční izolace a tudíž i speciace.

Reprodukční izolace a její mechanismy mohou fungovat ve třech etapách (Coyne a Orr 2004):

- 1) Předkopulačně – ke kopulaci vůbec nedojde
- 2) Před vznikem zygoty – nedojde ke vzniku zygoty
- 3) Postzygoticky – po vzniku zygoty je plod buď zlikvidován, nebo je potlačena jeho schopnost se rozmnožit

Z výše uvedeného vyplývá, že pozorování nekompatibilit hybridního genomu se týká úrovně třetí – postzygotické reprodukční izolace. Hybridi mají často sníženou plodnost a životaschopnost.

Vznik postzygotických reprodukčních bariér popisuje tzv. Dobzhansky – Muller model. Podle něj za vznik nekompatibilit může větší počet (minimálně dvě) alel. S rostoucí dobou izolace populací pak roste i počet těchto nekompatibilit (Orr 1996).

Pro studium postzygotické izolace jsou podstatná dvě uznávaná pravidla – Coyneovo pravidlo (Coyne 1992) a Haldaneovo pravidlo (Haldane 1922). Obě pravidla jsou podporována mnoha pokusy.

Coyneovo pravidlo říká, že geny zodpovědné za postzygotickou izolaci se většinou nacházejí na chromosomu X (Coyne 1992). K vysvětlení tohoto pravidla byly vytvořeny dvě teorie. První předpokládá rychlejší evoluci genů na pohlavních chromosomech ve

srovnání s autosomy (Charlesworth et al. 1987). Druhá předpokládá vliv intragenomického konfliktu zahrnujícího geny na pohlavních chromosomech (Frank 1991; Hurst a Pomiankowski 1991).

Haldaneovo pravidlo říká, že neživotaschopnost či sterilita u hybridů je většinou záležitostí heterogametického pohlaví (Haldane 1922). Toto pravidlo vysvětluje například dominantní teorie. Ta praví, že u heterogametického pohlaví se mohou snáze projevit recesivní škodlivé mutace na chromosomu X, protože projev takto zmutovaného genu nemůže být retušován projevem jiného genu z druhého chromosomu (Turelli a Orr 1995; Turelli a Orr 2000). Haldaneovo pravidlo se snaží objasnit i další teorie (Wu a Davis 1993).

2.1.3 Hybridní zóna myši domácí

Jednou z nejintenzivněji zkoumaných hybridních zón je oblast sekundárního kontaktu myších poddruhů *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* nacházející se v Evropě. Poddruhy myši domácí *Mus musculus* nám vlastně díky sekundárnímu kontaktu nabízí ke studiu hned dvě hybridní zóny, tou druhou je oblast hybridizace mezi *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* nacházející se především v Číně, která však není tak dobře prozkoumaná (Boursot et al. 1993).

Areál rozšíření *M. m. musculus* sahá od severu Číny přes střední Asii, Rusko a východní Evropu až po Evropu střední, kde se dostává do kontaktu s areálem *M. m. domesticus* (západní Evropa, sever Afriky, Amerika, Austrálie a Blízký Východ) (Boursot et al. 1993).

K evropskému kontaktu obou myších poddruhů dochází v přibližně 2500 km dlouhé linii, která je na šířku tvořena zhruba 20 kilometrů širokým pásem hybridních populací.

Jedná se o takzvanou tenzní hybridní zónu, která je udržována rovnováhou mezi selekcí proti vznikajícím hybridům a disperzí z rodičovských populací. Nemají tak na ní vliv faktory životního prostředí a není vázána na konkrétní geografickou oblast. Dokonce může docházet i k jejímu pohybu v případě, že se někde zvětší hustota mateřské populace a tato populace bude dodávat svůj genetický materiál do pásu hybridů intenzivněji, než druhá mateřská populace (Bazykin 1969). Tímto způsobem je zajištěno i ustálení pozice středu klin různých markerů. Pro tento typ hybridní zóny jsou proto charakteristické paralelní klíny, které mají shodnou šířku (konkordanci) i pozici (koincidenci) (Raufaste et al. 2005;

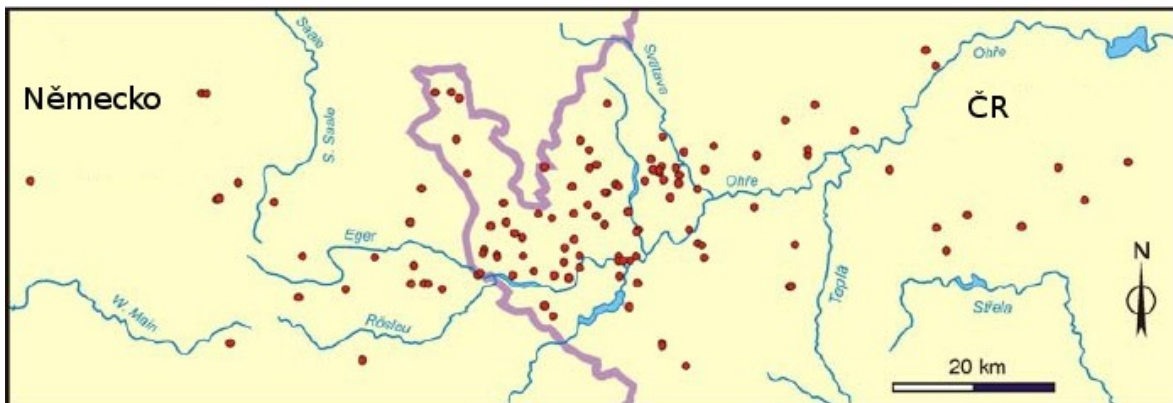
Macholan et al. 2008). Koincidence center klin je pravděpodobně udržována selekcí proti hybridům a je v tenzních zónách tudíž platná. Na druhou stranu konkordance je ovlivněna tím, zda sledujeme neutrální lokus, či lokus poblíž genu zodpovědného za vznik reprodukčních bariér (Barton a Gale 1993).

Ke kontaktu obou areálů myši domácí docházelo postupně od jihu k severu, přičemž stáří jižního konce hybridní zóny se odhaduje na 6000 let (Sage et al. 1993), zatímco severní část je stará přibližně jenom 250 let (Hunt a Selander 1973). Tento postupný kontakt je důsledkem historie kolonizace Evropy myšimi poddruhy (Boursot et al. 1993). Zóna probíhá přes Jutský poloostrov, střední Evropu a přes Balkán pokračuje až k pobřeží Černého moře (Boursot et al. 1993; Sage et al. 1993; Macholan et al. 2003) (Obr. 1 a 2). Ve střední Evropě protíná i západní okraj České republiky, kde je také intenzivně zkoumána (Macholan a Zima 1994; Munclinger et al. 2002; Bozikova et al. 2005; Macholan et al. 2007; Macholan et al. 2008; Macholan et al. 2011). Další oblasti intenzivního výzkumu leží v Bavorsku (Tucker et al. 1992; Payseur et al. 2004; Payseur et al. 2005; Payseur a Nachman 2005), východním Hostýnsku (Prager et al. 1997), Dánsku (Hunt a Selander 1973; Vanlerberghe et al. 1986; Dod et al. 2005; Raufaste et al. 2005) a Bulharsku (Macholan et al. 2003).

Poprvé byla hybridní zóna *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* na území České republiky identifikována v práci Macholan a Zima (1994), ale přesnou lokalizaci pomocí genetických markerů provedli až Munclinger et al. (2002). Od té doby se stal česko – bavorský transekt intenzivně zkoumanou částí hybridní zóny.



Obr. 1: Pozice hybridní zóny *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* v Evropě. Hybridní zóna je znázorněna tlustou čarou, česko-bavorský transekt zeleným obdélníkem.
Převzato a upraveno: Macholan et al. (2008)



Obr. 2: Mapa česko-bavorského transektu hybridní zóny myši s vyznačením lokalit, z nichž byli samplováni jedinci v práci Macholan et al. (2008).

Převzato a upraveno: Macholan et al. (2008)

2.1.4 Chromosomy v hybridní zóně myší

Autosomy mají v tomto transektu hybridní zóny desítky až stovky lokusů pod selekcí a fitness hybridů je tak snížena přibližně na polovinu (Macholan et al. 2007). Obdobně je tomu i v jiných úsecích zóny *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Raufaste et al. 2005; Teeter et al. 2010).

Odlišný průběh mají klíny samičího pohlavního chromosomu, které poukazují na značně sníženou introgresi (pronikání alel do cizího genomu) chromosomu X (Tucker et al. 1992; Dod et al. 1993; Macholan et al. 2007). Tento výsledek tak svědčí o zvýšené selekci na geny chromosomu X oproti autosomům. Samičímu chromosomu je tím přisouzena významná role při izolaci poddruhů myši domácí. Výsledky z českého transektu hybridní zóny jsou v dobré shodě nejenom s obdobnými pracemi z jiných částí zóny (Payseur et al. 2004), ale i s výzkumem introgrese při hybridizaci *Drosophila mauritiana* a *D. simulans*. U *Drosophila* bylo zjištěno, že na chromosomu X je zhruba 2,5 krát více faktorů odpovídajících za sterilitu než u autosomů (Tao et al. 2003). Všechny výsledky jsou tak v souladu s Coyneovým pravidlem o zvýšené koncentraci nekompatibilních genů na chromosomu X (Coyne 1992).

Mitochondriální DNA (mtDNA) se na rozdíl od autosomů a pohlavních chromosomů pohybuje přes hybridní zónu snadněji. Introgrese mtDNA velkého rozsahu jsou známé z různých částí hybridní zóny (Prager et al. 1993), a tak není divu, že se introgrese mtDNA vyskytuje i v českém transektu zóny hybridů (Bozikova et al. 2005). Klíny pro mitochondriální markery mají podobný průběh jako pro markery na autosomech, z čehož se dá usuzovat, že mtDNA i autosomy jsou pod podobnou mírou selekce. V geografickém měřítku jsou klíny pro mtDNA ve srovnání s chromosomem X vychýleny zhruba 3,5 km západně, což svědčí o introgresi mtDNA *M. m. musculus* na genetické pozadí *M. m. domesticus*. Zajímavé je navíc i to, že v sousedním transektu bavorském je zaznamenána introgrese opačného směru – přibližně 30 km na východ. Vysvětlení tohoto jevu je založeno na předpokladu, že se jedná o stochastický jev umožněný nízkou vazbou mezi jadernými geny a mtDNA. Tento předpoklad však nebyl dosud potvrzen.

Samčí pohlavní chromosom na většině míst hybridní zóny *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* vykazuje podobné klíny jako chromosom X (Vanlerberghe et al. 1986; Tucker et al. 1992; Prager et al. 1997; Dod et al. 2005). Selekcce na geny na něm ležící je zvýšená a

kliny odpovídají klinám chromosomu X i středovou pozicí. Chromosom Y se tak drží hranic vymezených hybridní zónou a nedochází k žádným introgresím. To je i v souladu s pravidlem, že pohlavní chromosomy jsou význačnými nositeli nekompatibilních genů (Haldaneovo pravidlo) (Haldane 1922). Co však v souladu s Haldaneovým pravidlem není, jsou výsledky z českého transektu hybridní zóny.

2.1.5 Introgrese chromosomu Y

V práci Munclinger et al. (2002) bylo zjištěno, že chromosom Y poddruhu *M. m. musculus* invaduje v poměrně velkém rozsahu na genetické pozadí poddruhu *M. m. domesticus*. Tato rozsáhlá introgrese byla později kvantifikována v práci Macholan et al. (2008). Ukázalo se, že Y *musculus* proniká do areálu *M. m. domesticus* v oblasti, která má tvar trojúhelníku a velikostně zabírá plochu zhruba o 330 km². Invaduje tak zhruba o 22 km dále, než je střed hybridní zóny. Zjištění rozměrů této introgrese je založeno na nestandardním přístupu ke studiu středu hybridní zóny. Za střed tenzní hybridní zóny se většinou považuje střed klin všech zkoumaných lokusů, který bývá shodný díky předpokladu koincidence. Takový přístup však v českém transektu hybridní zóny není možný. Macholan et al. (2008) proto stanovil střed hybridní zóny nejprve pro lokusy na chromosomu X a poté nový střed hybridní zóny pro chromosom Y. Dokázal tak lépe popsat geografické hranice introgresní oblasti chromosomu Y *M. m. musculus*. Pro lokusy na Y platí střed hybridní zóny se sklonem 62° od severu. Střed hybridní zóny stanovený podle lokusů z X zaujímá k severu sklon 23°.

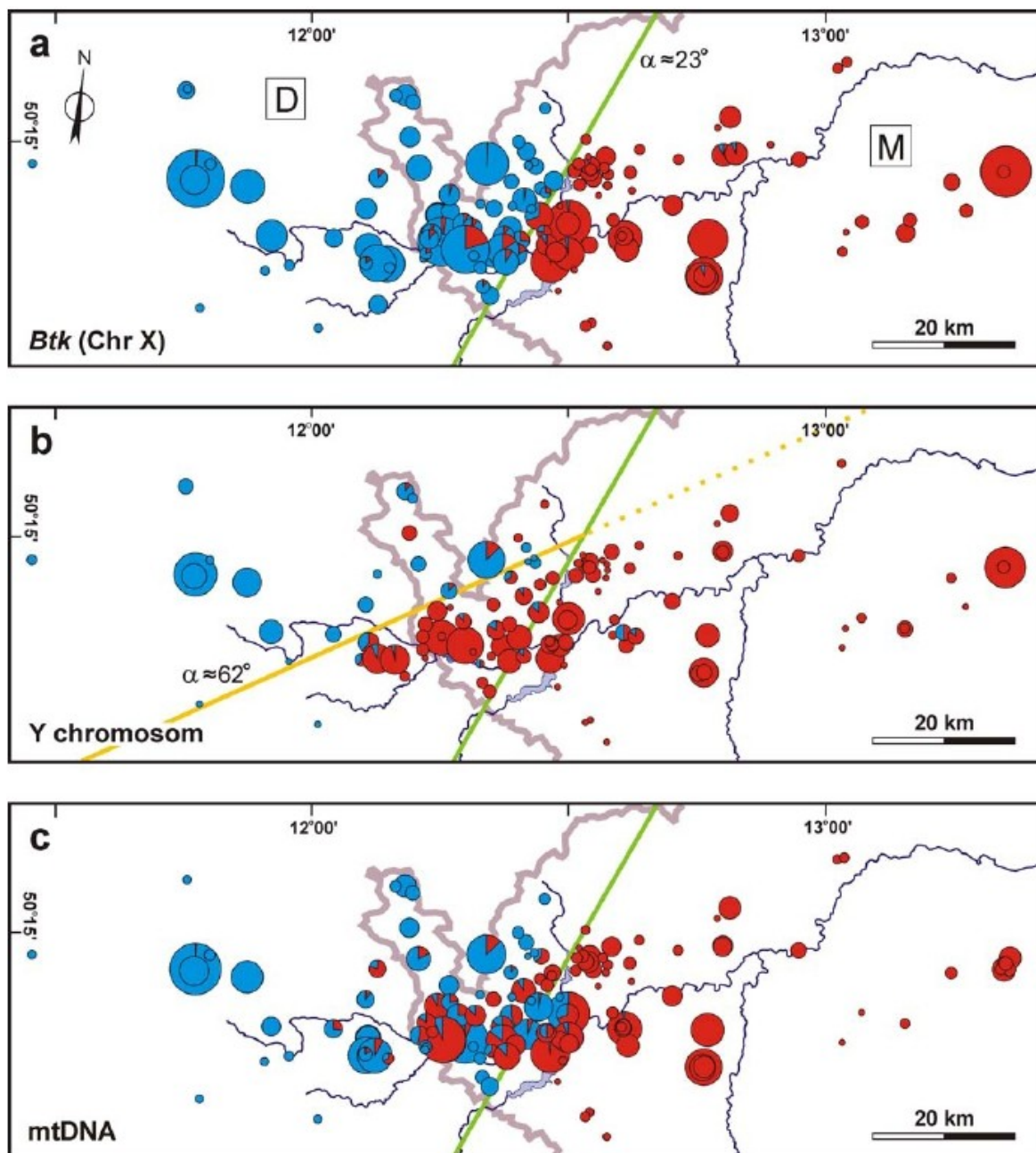
Zajímavé je, že introgrese chromosomu Y se odehrává ve stejném směru, jako introgrese mtDNA (Bozikova et al. 2005). To by nasvědčovalo jakémusi svezení se mtDNA s invazí Y *musculus*. Vzhledem k svázání jejich dědičnosti s odlišnými pohlavími to ale není možné. Tvar introgresní oblasti mitochondriální DNA je navíc mnohem rozrůzněnější než relativně dobře ohraničená oblast výskytu Y *musculus* v oblasti *M. m. domesticus*. Takový tvar pak poukazuje na to, že introgrese mtDNA je staršího data než introgrese Y.

Popsaný vzor rozšíření samčího chromosomu ukazuje na výhodu Y *musculus* před Y *domesticus* (Macholan et al. 2008). To je ovšem vzhledem k znalosti agresivního chování obou poddruhů překvapivé. Samci *M. m. domesticus* bývají mnohem agresivnější než samci druhého poddruhu a své soky často vytlačují (Munclinger a Frynta 2000).

K objasnění vzniku introgresní oblasti byla vytvořena teorie, vysvětlující jej pomocí intragenomického konfliktu (Macholan et al. 2008).

Intragenomický konflikt zahrnující geny na pohlavních chromosomech vzniká tehdy, když nějaký gen na pohlavním chromosomu dokáže zvětšit pravděpodobnost přenosu tohoto chromosomu do další generace. Takovému genu se říká distorter. Bude-li se takový gen navíc nacházet na chromosomu ze samce, dojde v populaci k vychýlení poměru pohlaví. Tím ale v oné populaci vzniknou výhodné podmínky pro evoluci genů, které budou toto vychýlení vracet do původního stavu, tzv. supresorů. Supresory se budou v populaci rychle fixovat, až úplně potlačí efekt distorterů (Meiklejohn a Tao 2010). Podobný boj o rovnoměrný poměr pohlaví však může znovu nastat. V genomu se tak může vyskytovat několik distorterů zároveň se supresory. Navíc v každé z izolovaných populací mohou vzniknout jiné varianty těchto genů. To po vzájemném sekundárním kontaktu a hybridizaci může vést k rapidnímu snížení plodnosti hybridů a výraznému zesílení izolační bariéry (Frank 1991; Hurst a Pomiankowski 1991).

Teoreticky však může nastat i varianta, že se distorter ocitne v hybridním genomu bez svého supresoru a vychýlí poměr pohlaví (Macholan et al. 2008). V takovém případě však nastanou opět podmínky vhodné pro fixaci nového supresoru, který bude zvýhodňovat druhé pohlaví. Tím může nastat situace podobná pozorování z českého transektu hybridní zóny myši (Munclinger et al. 2002). Podle této teorie pravděpodobně nejprve proběhlo zvýhodnění samičího pohlaví, následované zvýhodněním pohlaví samčího. Nasvědčuje tomu vzor introgrese mtDNA (Bozikova et al. 2005) i introgrese chromosomu Y. Navíc bylo zjištěno, že poměr samců v introgresní oblasti je skutečně větší než v oblastech rodičovských populací (Macholan et al. 2008). Správnost této teorie potvrzuje i fakt, že některé části chromosomu X vykazují introgresi v západním směru také, zatímco většina ostatních částí má úzké klíny lokalizované přesně ve středu hybridní zóny. Na těchto částech chromosomu X se pak dá očekávat výskyt distorterů zvýhodňujících samičí pohlaví (Macholan et al. 2011). Přestože teorie o intragenomickém konfliktu, který způsobil pozorovaný vzor chromosomu Y, je velmi pravděpodobná, dosud chybí například analýza variability uvnitř a vně introgresní oblasti. Předpokládá se, že únik distorteru svému supresoru je značně ojedinělý úkaz. Dá se proto usuzovat, že se tak stalo v genomu velmi málo jedinců.



Obr. 2: Frekvence alel napříč myši hybridní zónou v česko-bavorském transektu. Frekvence alel *M. m. musculus* jsou znázorněny červeně, *M. m. domesticus* modře. Frekvence alel jsou znázorněny pro marker na chromosomu X (a), chromosomu Y (b) a mtDNA (c). Koláčové diagramy jsou proporčně upraveny dle velikosti vzorku. Zelená linie označuje střed hybridní zóny pro markery na chromosomu X, žlutá pro markery na chromosomu Y.
 Převzato a upraveno z: Macholan et al. (2008)

2.2 Myš jako modelový organismus

2.2.1 Sociální struktura myší

Populační struktura myší je natolik komplexní, že i přes značný počet experimentů v této oblasti, je mnoho věcí stále nejasných. Většina dat o sociální struktuře a disperzi myší je získána z laboratorních pokusů, které nebývají často snadno interpretovatelné na divoce žijící populace. Zdrojem poznání je obvykle poddruh *Mus musculus domesticus* a pouze se předpokládá, že i ostatní poddruhy se chovají stejně (shrnuto v Pocock et al. 2005).

Při výzkumech dělaných v terénu se myši rozlišují na dvě části. Populace žijící čistě komenzálním způsobem (v sýpkách, stodolách) a populace volně žijících myší, které většinou osídlují člověkem vytvořené biotopy, jako jsou například pole.

Na svých stanovištích tvoří *Mus musculus* populační strukturu zvanou dem. Jedná se o malou skupinu jedinců, kterou ovládá jeden dominantní samec. Skupina je složena ze samic a případně i několika podřízených samců (Gray et al. 2000). Dem u komenzálních populací zaujímá většinou teritorium o přibližné rozloze 2 m² a je dominantními samci agresivně bráněn. Populace se pak skládá z desítek demů a zabírá rozlohu zhruba 70 m². U volně žijících populací jsou demy pravděpodobně tvořeny také, ale přesvědčivá analýza dosud chybí. V případech, kdy hustota jedinců není vysoká, jsou agresivní vztahy mezi samci mírnější. Teritorium je bráněno většinou jen proti jedincům stejného pohlaví (Fitzgerald et al. 1981). Často se tak děje u volně žijících populací, které mívají hustotu zhruba 150 jedinců na hektar.

Populace myši domácí tvoří poměrně dynamickou a nestabilní strukturu. Je to dáno velkým obratem jedinců, který může být i 6 generací za rok (Pocock et al. 2004) i častou disperzí, která se však obtížně měří (Krebs 2003). Dominantní postavení samců v demech se navíc často mění (Reimer a Petras 1967). Zhruba polovina demů vyhyne do jednoho roku a je vyměněna nově vzniklým demem (Hauffe et al. 2000). Svým způsobem k dynamice populací *Mus musculus* přispívá i její komenzální způsob života. Často jsou totiž ovlivňovány disturbancemi způsobenými člověkem. Díky vyprazdňování sýpek tak dochází například i k pravidelným migracím myší do polí v jarním období (Carlsen 1993). Na podzim se pak takové populace často opět vrací do lidských staveb zpět patrně kvůli nárůstu kompetice s ostatními drobnými hlodavci. K migracím dochází kvůli měnící se

kvalitě habitatu i u čistě volně žijících populací (Stickel 1979). Disperze i migrace tak neodmyslitelně k myši domácí patří.

2.2.2 Disperze u myši domácí

Disperze *Mus musculus* se liší mezi komenzálně a volně žijícími populacemi. Komenzálně žijící myši vykazují stabilnější populační strukturu a menší počet disperzí, které navíc málokdy přesahují hranici 25 metrů (shrnuto v Pocock et al. 2005). Volně žijící jedinci cestují dál. Liší se i poměrem pohlaví, které cestuje. U komenzálních myší jsou samice více usedlé než u volně žijících. U obou typů populací však platí, že samci cestují více a největší podíl v počtu migrujících jedinců mají mladí samci (Rowe et al. 1963; Pocock et al. 2004). Demy si takto vymění až 20% jedinců. Většina z nich však z nového demu zmizí do několika dní (Hauffe et al. 2000). Ke zvýšenému počtu migrací dochází v případech, kdy je snížena nosná kapacita prostředí. Většinou se tak děje u komenzálních populací lidskou disturbancí, protože v přírodě hlídá přemnožení jedinců poměrně značně rozvinutá sociální interakce mezi jedinci (Pocock et al. 2005). Po vyprázdnění sýpek bylo zaznamenáno zvýšené procento migrujících jedinců. Myši také migrovaly na mnohem větší vzdálenosti dosahující hranice 200 metrů i více. Nejdelší takový zaznamenaný přesun byl dlouhý přes 650 metrů (Baker a Petras 1986). Měření disperze a migrace u myší je však technicky poměrně náročné. Východiskem se proto zdá používání genetických markerů. V současné době jsou to především mikrosatelity (Panithanarak et al. 2004) a mtDNA (Jones et al. 1995). Jones et al. (1995) pomocí mtDNA a markerů na jaderné DNA zjistili, že po introdukování skupiny jedinců na ostrov se zavedenou populací došlo k poměrně rychlému rozšíření nukleárního genomu do stabilní populace myší na ostrově, zatímco mtDNA zůstala pouze v místě introdukce. Zatímco samci tak rozšířili svůj genom po celé populaci, samice se zdají žít usedle.

Migrace není u myší zaznamenána však pouze aktivní, ale i pasivní. Ta je umožněna transportem s člověkem. Jedná se o, mezi obratlovci, ojedinělý způsob drobných hlodavců, jak rozšiřovat svoje teritoria. Jedinci se tak mohou šířit na vzdálenosti značně převyšující jejich normální dosah (shrnuto v Pocock et al. 2005). Existuje mnoho evidencí, že tento způsob disperze má značný vliv na expanzi *Mus musculus* (shrnuto v Boursot et al. 1993). Je logické, že častěji se budou s lidmi šířit populace komenzální, než volně žijící. Na tak vysoké procento jedinců s člověkem cestujících, existuje překvapivě málo zaznamenaných evidencí (Pocock et al. 2005). Baker (1994) vypočítala, že na 100 tun převáženého zrní

připadá zhruba 7 jedinců myši domácí. Obdobně na 100 tun sena připadá přibližně 70 převážených myší. Je tak evidentní, že transport lidských komodit má na šíření *Mus musculus* nezanedbatelný efekt. Jedinci se často schovávají do zásob jídla a stávají se nedobrovolnými černými pasažéry. K tomuto typu disperze je navíc předurčuje i jejich schopnost vydržet dlouhou dobu bez vody a množit se i při transportu (shrnuto v Pocock et al. 2005). Pravděpodobně nejrecentnějším záznamem o pokus dálkové migrace je malý hlodavec, který svou přítomností na palubě zastavil odlet letadla ze Stockholmu do Chicaga (Bursell 2011). Díky počtu migrujících myší lze předpokládat, že má migrace velký efekt na tok genů v populacích *Mus musculus*.

Reimer a Petras (1967) při pokusech s arénou v laboratoři zjistili, že demy jsou poměrně uzavřené a tok genů mezi nimi je omezen. Samci, kteří se pokusili introdukovat do demu, byli po chvíli napadeni dominantním samcem a občas i samicemi. Většina takových samců pak do 12 hodin umírala na svá zranění. Přijato do skupiny bylo jen 20% samců. Samice migrují sice v menším procentu případů, ale jejich šance introdukovat se do demu je vyšší. Míra efektivní migrace je stanovena na 1 – 3 jedince na dem na generaci a je tedy poměrně nízká (Hauffe et al. 2000). Míru agrese dominantního samce vůči migrantům ovlivňuje členitost terénu. Čím je terén nepřehlednější, a tedy i bližší přirozeným podmínkám, tím se útoku od dominantního samce vyhne více vetřelců (Gray et al. 2000). Čím je větší počet vetřelců, tím více se jich dokáže do demu začlenit a přežít (Reimer a Petras 1967). V přirozených populacích se proto dá předpokládat mnohem větší tok genů než v laboratorních pokusech.

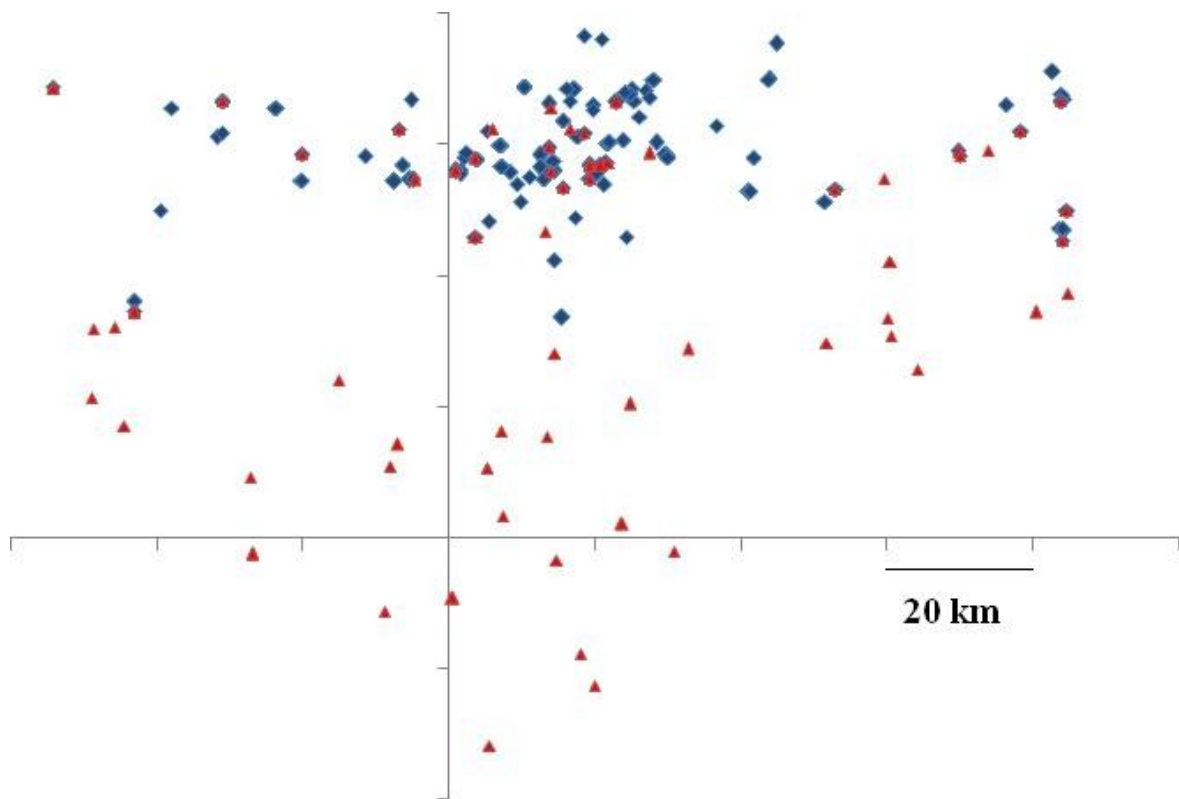
3 Cíle práce

- Otestovat sadu variabilních mikrosatelitových markerů na chromosomu Y *M. m. musculus* vhodnou k analyzování populační struktury myši domácí a analýze historie vzniku introgrese chromosomu Y v hybridní zóně myši domácí.
- Potvrdit či vyvrátit předpoklady o sociální struktuře demů v myších populacích.
- Učinit odhad o disperzi samců v myších populacích.
- Provést pilotní studii pro analýzu historie rozsáhlé introgrese chromosomu Y v česko-bavorském transektu hybridní zóny myši domácí.
- Dát vlastní poznatky do souvislosti s předpokladem role konfliktu genů a pohlaví v česko-bavorském transektu hybridní zóny myši domácí.

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky DNA

Data pro naše analýzy byla získána ze vzorků izolované DNA o koncentraci 10 – 100 ng/μl uložených při 5°C v Laboratoři pro výzkum biodiverzity na katedře zoologie PřF UK v Praze. Pocházejí z jedinců *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* ulovených v rámci výzkumu česko-bavorského transektu hybridní zóny v letech 1991 až 2010. Některé vzorky byly použity v předchozích molekulárních analýzách (Munclinger et al. 2002; Bozikova et al. 2005; Macholan et al. 2007; Macholan et al. 2008; Macholan et al. 2011). Pro cíle mé diplomové práce bylo použito 982 vzorků z celkem 161 populací v česko-bavorském transektu myší hybridní zóny. Kompletní haplotypy na všech šesti mikrosatelitových lokusech poskytlo 689 z nich. Ty byly dále použity v analýzách. Rozmístění lokalit v prostoru zobrazuje Obr. 4. Lokality pocházejí z oblasti introgresního trojúhelníku, populace *Mus musculus musculus* a populace *Mus musculus domesticus* bez chromosomu Y *musculus*. Počet lokalit použitých k analýzám, kde bylo třeba stanovit přesné rozdělení do těchto tří oblastí, je 90. Do oblasti introgrese Y bylo zařazeno 35 lokalit. Oblast výskytu *M. m. musculus* je v našich datech zastoupena 45 lokalitami. Lokality, na nichž se vyskytuje *M. m. domesticus* bez Y *musculus* jsou v našich datech zastoupeny v počtu 10. Omezení množství lokalit ze základního počtu do počtu s přesným přiřazením oblasti je dáno nejasným postavením některých lokalit vzhledem k oblasti výskytu.



Obr. 4: Mapa rozmístění lokalit v prostoru. Modře jsou vyznačeny lokality, na nichž byli odchytení jedinci před rokem 2009, červeně lokality s odchycením samic v roce 2010. Osy x a y zobrazují souřadnice v transektu v kilometrech.

4.2 Polymerázová řetězová reakce

Primery pro studium chromosomu Y byly odvozeny ze známé sekvence inbredního kmene laboratorní myši C57BL/6. K analýzám bylo použito šest mikrosatelitových lokusů označených 5036, 5045, 7245, 6132, 7322 a 7419. Sekvence a fluorescenční značení primerů pro tyto lokusy, stejně jako množství primerů ve 100 μ l primer mixu jsou shrnuty v Tab. 1. Primer mix pro Multiplex PCR byl smíchán z příslušného množství primerů (Tab. 1), doředěných do 100 μ l ddH₂O. V zásobním roztoku měly primery koncentraci 0,1 mM.

Lokus	Značení	F/R	Sekvence primeru	Objem v primer mixu (μl)
5036	6FAM	F	TGCTGTGGAAGTGAACAGAAA	1
5036		R	AACTAGCCAGGTCACCAGACA	1
5045	PET	F	TGAAATAAACCAGGGCAAAAA	1
5045		R	ACATGATTGCTAACCCCTTCC	1
7245	PET	F	GGGTCCTTAAAATTGGTTGCT	1
7245		R	AGTAAAGGAGGCCGATCATGT	1
6132	6FAM	F	AAAGAAGAGCCAGGAGTGAGC	1
6132		R	TTACCCAGCTGTTCTTCCCTT	1
7322	VIC	F	TGACCACTCTGGCTCATCTTT	1
7322		R	CATGAGCTAATTTGCCTCTGC	1
7419	NED	F	CGTTCCAATATCAACCCCTTT	1
7419		R	CTGTTGCAAAAGCAAAAGACA	1

Tab. 1: Sekvence použitých primerů a jejich množství ve 100 μl primer mixu. F/R označuje forward (F) a reverse (R) primery.

Pro PCR jsem použil reakční směs složenou ze 4 μl Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2x (Qiagen) a 1 μl primer mixu na 3 μl DNA. Celkový objem jednoho vzorku tak činil 8 μl. Poměry složek směsi jsou znázorněny v Tab. 2.

Složky PCR směsi	Objem na 1 vzorek (μl)
Type-it Multiplex PCR MM	4
Primer mix	1
DNA	3

Tab. 2: Protokol na Multiplex PCR

PCR reakce byly prováděny v thermocyleru Mastercycler (Eppendorf, Německo) pomocí programu znázorněného v Tab. 3.

Teplota	Délka	Počet cyklů
95 °C	5 min	1x
95 °C	30 s	
51 °C	90 s	30x
72 °C	30 s	
60 °C	30 min	1x

Tab. 3: Program PCR

4.3 Fragmentační analýza

Posléze byly vzorky připraveny na fragmentační analýzu. Jeden mikrolitr vzorku byl smíchán s 9 μ l směsi na fragmentační analýzu. Ta se skládala z 9 μ l formamidu a 0,3 μ l standardu na jeden vzorek. Jako standard byl použit Gene Scan 500LIZ size standard (Applied Biosystems). Poměry složek směsi jsou znázorněny v Tab. 4. Vzorky byly posléze denaturovány při 95°C po dobu 2 - 3 minut. Fragmentační analýza byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

Složky směsi	Objem na 1 vzorek (μl)
Formamid	9
Gene Scan 500LIZ	0,3
PCR produkt	1

Tab. 4: Směs pro fragm. analýzu

Posléze byla data z fragmentační analýzy zpracována v programu GeneMarker (Softgenetics), kde byla díky použitému standardu odečtena délka PCR produktů. Byly tak změřeny všechny alely pro každý lokus daného jedince. Výsledná tabulka s alelami všech jedinců byla exportována do Microsoft Office Excel. V tomto programu byla ke všem jedincům přiřazena známá informace o lokalitě, datu a místu odchytu.

4.4 Statistické analýzy

Statistika znázorňující variabilitu našich lokusů souhrnně i napříč populacemi byla počítána v Microsoft Office Excel. Ostatní složitější statistické výstupy z našich dat byly dělány v statistickém programu R Project for Statistical Computing verze 2.13.0 (<http://www.r-project.org>).

K stanovení geografické polohy hybridní zóny pro jednotlivé genetické markery bylo využito klastrování založené na Bayesovském modelování pomocí programu GENELAND 3.2.4 (Guillot et al. 2005). Program využívá přístupy založené na MCMC (Markov chain Monte Carlo) a kombinuje genotypy jedinců s jejich geografickými souřadnicemi, aby lokalizoval případné diskontinuity mezi populacemi v prostoru. Pro naše analýzy markerů na chromosomu Y a *Foxp3* na chromosomu X bylo nastaveno fixní K na hodnotu 2, protože v hybridní zóně se nalézají právě dva poddruhy myši domácí. Počet opakování

běhu byl nastaven na 100 000 pro *Foxp3*, ukládán byl každý desátý. Pro markery na chromosomu Y byl počet opakování běhu 1 000 000, uložen byl každý stý. Při zpracovávání po běhu programu bylo vyloučeno prvních sto opakování pro *Foxp3*, resp. 1000 opakování pro markery na Y. Pro analýzu markeru 5036 z chromosomu Y nebyl počet populací předem znám, proto byl program spuštěn bez zadání počtu K. Program stanovil při běhu MCMC jako nejvýhodnější počet klastrů 4. Analýza proto byla provedena s fixním počtem $K = 4$. Počet opakování běhu byl nastaven na 100 000, ukládal se každý desátý. Při následném zpracování bylo vyloučeno prvních 100 opakování. Data pro lokus 5036 pro naše vzorky byla získána z našich analýz, data pro Y a *Foxp3*, byla získána z práce Macholan et al. (2011).

Výpočet vzdáleností lokalit proběhl ze souřadnic hybridní zóny pomocí výpočtu euklidovských vzdáleností (viz. Obr. 5).

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

Obr. 5: Výpočet euklidovských vzdáleností

V programu GenAEx 6.41 (Peakall a Smouse 2006) byla vypočítána analýza molekulární variance (AMOVA) pro získání poměru variability uvnitř a mezi populacemi přímo z molekulárních dat. AMOVA je jeden z nejnovějších statistických testů zabývajících se stanovováním genetické variability na základě hierarchického uspořádání populací a subpopulací. Pokud je nějaká populace rozdělena na subpopulace, jsou tyto subpopulace méně heterozygotní, než kdyby rozděleny nebyly. Důvodem, proč se tak děje, je rychlejší fixace jiných frekvencí alel v menších populacích díky genetickému driftu. Snížení heterozygotnosti zapříčiněné rozdělením populací se obvykle určuje pomocí F statistiky. AMOVA je na poli počítání F_{st} (resp. jeho variant) poměrně důležitou statistickou procedurou, neboť umí počítat s rozličnými typy genetických markerů a nabízí statistické testování pomocí náhodných permutací. Poskytuje tak odhad populační diferenciace. V programu GenAEx 6.41 je místo F_{st} používán analogický koeficient Φ_{PT} . Ten je stanovován dle vzorce: $\Phi_{PT} = V_{AP}/(V_{AP}+V_{WP})$, kde V_{AP} je variabilita mezi

populacemi a V_{WP} je variabilita uvnitř populací. Φ_{PT} tak nabývá hodnot mezi 0 až 1, dle míry genetické rozdílnosti populací. AMOVA pak určuje jaký podíl genetické variability je vysvětlen v rámci populací a jaký mezi nimi. Pro náš výpočet byl počet permutací nastaven na 9999. Zadána byla haploidní data.

Genetické vzdálenosti mezi populacemi pro pozdější výpočty stromů byly získány opět pomocí AMOVA v programu GenAlEx 6.41, který využívá výpočty dle Slatkin (1995). Genetické vzdálenosti mezi populacemi určuje koeficient R_{st} analogický k F_{st} . Na rozdíl od F_{st} ale zvažuje i SSM (step-wise mutation model) pro lepší charakterizaci mikrosatelitových lokusů. Platnost tohoto modelu byla v mých analýzách předpokládána. Výpočet R_{st} probíhá dle vzorce: $R_{st} = V_{AP} / (V_{WI} + V_{AI} + V_{AP})$, kde V_{AP} je variabilita mezi populacemi, V_{WI} je variabilita uvnitř populací a V_{AI} je variabilita mezi jedinci uvnitř populací. Koeficient nabývá hodnot -1 až 1 dle míry genetické vzdálenosti populací. Pro naše analýzy byla data přeepsána dle počtu jednotek opakování mikrosatelitů. Počet permutací pro výpočet byl nastaven na hodnotu 999.

Výstup byl získán jako párová matice R_{st} . Ta byla později využita spolu s maticí euklidovských vzdáleností populací k výpočtu Mantelova testu pro zjištění izolace se vzdáleností. Mantelův test byl prováděn opět v programu GenAlEx 6.41. Počet permutací pro výpočet byl nastaven na 999. Mantelův test je statistický test určený ke korelaci mezi dvěma maticemi. V našem případě byl určen k porovnání genetické izolace se vzdáleností. Pomocí tohoto testu se dá určit, zda jsou si více příbuzné sousední populace, či populace vzdálené.

Získaná párová matice genetických vzdáleností R_{st} byla využita k sestrojení stromu založeného na metodě Neighbor-Joining pomocí MEGA software ver. 5.05 (Kumar et al. 2008). Tento fylogenetický strom odhaluje vzájemnou podobnost populací na mých lokalitách za předpokladu SSM (step-wise mutation model).

V programu BAPS 5.4 (Corander a Tang 2007) byl vytvořen strom založený na příbuznosti jedinců. Program byl puštěn několikrát s různými K (5, 10, 20, 50, 100 a 150) pro model s lokusy ve vazbě. Jako nejvýhodnější vyhodnotil program běh pro 76 klastrů.

5 Výsledky

Pro cíle diplomové práce bylo nejprve třeba zjistit vhodnost použitých mikrosatelitových markerů k analýzám populační struktury a historie introgrese chromosomu Y. Vznikla tak tabulka popisující variabilitu lokusů pomocí množství alel, které se na nich vyskytují (Tab. 5) a tabulka popisující variabilitu lokusů podle množství alel na lokus na jednotlivých lokalitách (Tab. 6). Ukázalo se, že nejvariabilnější lokus použitý v mých analýzách je 7419. Nejméně variabilní lokus 5036 pak dosahoval počtu čtyř alel.

Lokus	5036	6132	7322	7419	5045	7245
Počet alel	4	8	11	18	5	11
Jednotka opakování	4	4	3	2	4	3

Tab. 5: Počet alel vyskytujících se na jednotlivých lokusech a jejich jednotky opakování.

Pro zjišťování parametrů týkajících se populační struktury a disperze samců v hybridní zóně je nutné mít lokusy, které mají několik alel i při zúžení pohledu na jednotlivé lokality. Moje data toto kritérium velmi dobře splňují. V deseti případech ze 136 se v nich vyskytují lokality, které mají pět a více alel na jednom lokusu.

V mých analýzách se objevují data ze 689 samců z hybridní zóny patřících do 161 lokalit. Nejmenší počet samců na lokalitě je 1, nejvíce genotypovaných samců má lokalita PLES a to 46. Průměrný počet samců na lokalitu je 4,28.

Lokalita	Počet jedinců	Lokus					
		5036	6132	7322	7419	5045	7245
AVES	2	1	1	1	1	1	1
BENK	8	1	2	3	1	2	3
BEZ2	3	2	3	2	3	2	2
BIR2	1	1	1	1	1	1	1
BIR4	3	1	1	1	1	1	1
BLAZI	1	1	1	1	1	1	1
BOUC	6	1	2	3	4	2	4
BRAU	8	2	2	2	3	2	3
BUS1	2	1	2	2	2	2	2
BUS2	20	2	4	1	3	3	2
BUS3	1	1	1	1	1	1	1
BUS5	1	1	1	1	1	1	1
CHL1	7	2	2	2	2	1	2
CHO1	8	1	4	4	4	1	4
CHO2	4	1	2	2	2	1	2

CHR11	2	1	1	1	1	1	1
CIRA	2	1	1	1	1	1	1
DEPO	3	2	2	2	2	2	3
DEVI	2	1	1	1	1	1	1
DLMO	5	1	2	3	2	1	2
DODV	10	1	4	3	4	3	4
DOLI	9	2	5	6	5	3	4
DOLN	17	1	3	4	3	3	3
DOU2	1	1	1	1	1	1	1
DOU3	6	2	3	4	3	2	3
DOZ3	1	1	1	1	1	1	1
DPEL1	2	1	1	1	1	1	1
FRIE09	1	1	1	1	1	1	1
GROSS	1	1	1	1	1	1	1
HABA	1	1	1	1	1	1	1
HAM1	5	1	1	2	2	2	2
HAZHO	1	1	1	1	1	1	1
HAZSH	1	1	1	1	1	1	1
HEBA	3	1	1	1	1	1	1
HLAV	3	1	3	3	3	1	3
HODO	2	1	1	1	1	1	1
HOHE1	14	1	2	3	3	2	3
HOHE2	1	1	1	1	1	1	1
HOSL	5	1	1	1	1	1	1
HRE1	1	1	1	1	1	1	1
HRZI	1	1	1	1	1	1	1
HUR1	21	1	1	1	1	1	2
HUR3	2	1	1	1	1	1	1
HVES	7	2	2	4	5	3	5
JIND	5	1	1	1	2	1	2
JIND31	6	1	1	1	1	1	1
JOSE	3	1	1	1	1	1	1
KAC1	10	1	3	3	4	2	4
KAC2	12	2	3	2	5	3	5
KLES	1	1	1	1	1	1	1
KOP1	6	1	1	1	1	1	1
KOP37	1	1	1	1	1	1	1
KOZL	1	1	1	1	1	1	1
KRA1	2	1	1	1	1	1	1
KRA2	6	1	2	1	2	2	2
KRA20	1	1	1	1	1	1	1
KRA3	5	1	2	1	2	2	2
KRASIK	1	1	1	1	1	1	1
KRAU	3	2	1	2	2	1	2
KRIZ1	4	1	3	3	4	2	4

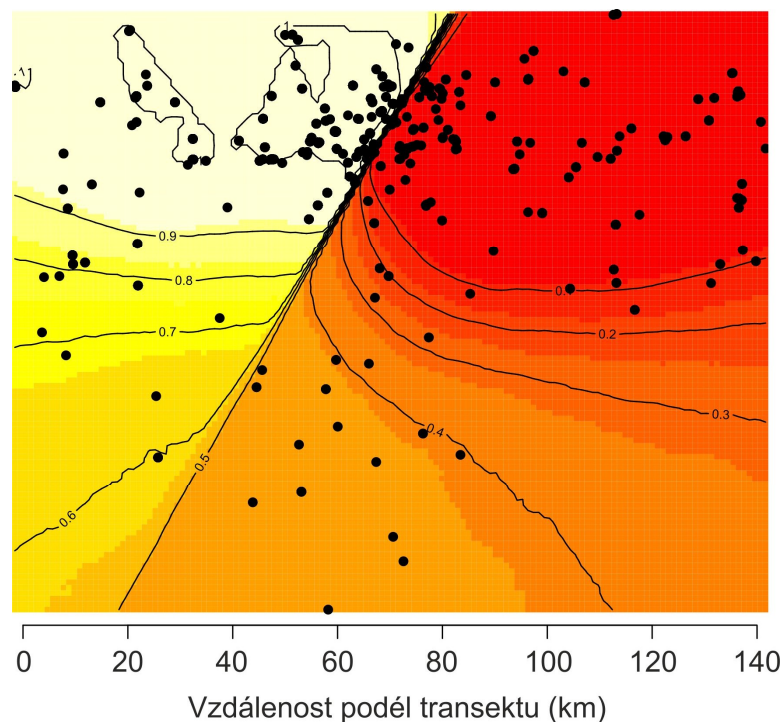
KRIZ2	1	1	1	1	1	1	1
KRSOV	1	1	1	1	1	1	1
KUBL1	3	1	2	2	3	1	1
KUBL2	1	1	1	1	1	1	1
KVET	5	1	1	1	1	1	1
LEHS	8	1	2	2	2	1	2
LIB1	2	1	1	1	1	1	1
LIB2	1	1	1	1	1	1	1
LIPOL	1	1	1	1	1	1	1
LIPOV	1	1	1	1	1	1	1
LOMA	2	1	1	1	1	1	1
LUZN	15	2	4	4	6	3	5
MAIE	4	1	2	2	2	2	2
MIL1	7	2	2	3	3	2	3
MIL3	2	1	2	2	2	2	2
MLYN49	1	1	1	1	1	1	1
MOST1	3	1	1	1	1	1	1
MOST2	8	1	3	2	3	2	3
MUNR	3	1	2	2	2	2	3
NDR14	3	1	2	2	2	1	2
NDRA	5	1	1	1	1	1	1
NDRF	1	1	1	1	1	1	1
NEB2	1	1	1	1	1	1	1
NEB3	21	2	5	5	5	2	4
NEU15	2	1	1	1	1	1	1
NEU8	3	1	1	1	1	1	1
NEUE	15	2	5	5	5	3	6
NKOS	4	1	2	2	1	1	3
NVCHC	9	2	2	3	3	2	3
NVOK	3	1	1	1	1	1	1
NVPO	7	1	1	1	1	1	1
NVTE	4	1	2	2	2	2	2
OBIL1	18	1	3	5	5	2	4
OBIL2	13	1	3	3	3	2	3
ODR26	4	1	2	2	2	2	2
OTTM	7	1	1	1	1	1	1
PAST	5	1	3	2	3	3	3
PERNA	1	1	1	1	1	1	1
PILW	3	1	2	1	2	1	2
PLES	46	2	4	3	5	3	4
PLOSB	1	1	1	1	1	1	1
POC1	2	1	1	1	1	1	1
POC2	1	1	1	1	1	1	1
POU1	7	1	3	3	4	2	3
POU15	1	1	1	1	1	1	1

POU2	7	2	3	4	4	3	4
PRE11	4	2	1	1	3	2	2
PRGA	9	1	1	1	1	1	1
PROH	4	1	3	3	2	1	3
PRPR	1	1	1	1	1	1	1
RIEG	1	1	1	1	1	1	1
RUD1	4	2	3	3	3	2	3
RUD2	10	3	3	3	2	2	2
RUD3	1	1	1	1	1	1	1
RUD4	3	1	1	2	2	1	1
SABIH	2	1	1	1	1	1	1
SKCH	2	2	2	2	2	2	2
SPAL	1	1	1	1	1	1	1
SSED	1	1	1	1	1	1	1
STHR7	1	1	1	1	1	1	1
STR2	24	2	3	3	4	2	6
STRI	2	1	1	1	1	1	1
THIE	8	2	3	5	5	3	5
TYN2	3	1	3	1	1	2	3
UNWE	6	1	3	4	2	2	3
VER1	2	1	1	1	2	1	1
VRB7	1	1	1	1	1	1	1
VRBI	2	1	1	1	1	1	1
VRBI23	3	1	1	1	1	1	1
WEIC22	1	1	1	1	1	1	1
WOCH	8	1	1	1	1	1	1
WOHL	6	2	3	3	2	2	3
ZEBNI	2	1	2	2	1	2	1
ZIH133	1	1	1	1	1	1	1
ZIH50	4	2	1	1	2	2	2
ZIHL	1	1	1	1	1	1	1

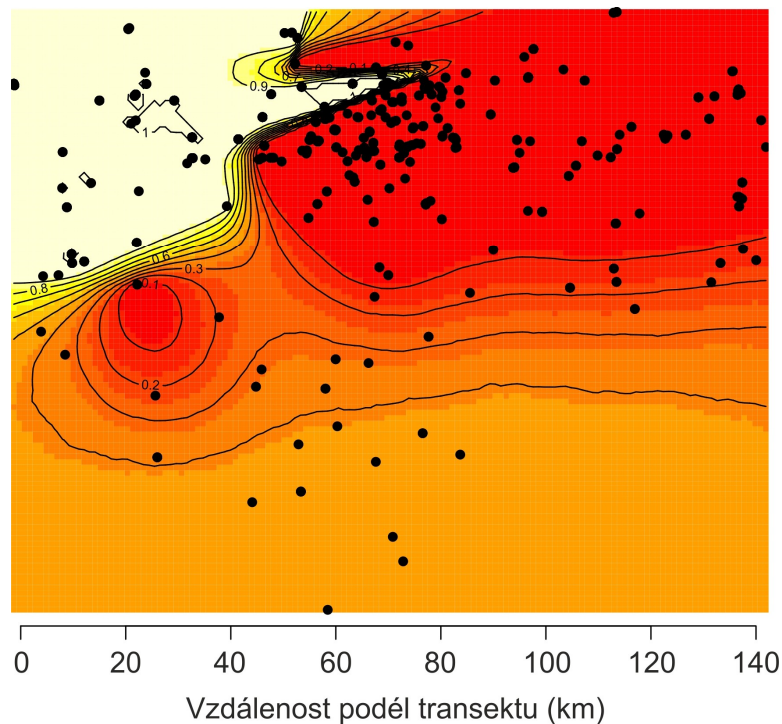
Tab. 6: Srovnání lokalit z hlediska počtu jedinců a počtu alel na lokusech.

Geografická analýza přechodu lokusů přes hybridní zónu vykazuje rozdílný vzor pro všechny analyzované lokusy i diagnostické markery na chromosomu Y a diagnostický *Foxp3* pro chromosom X. Moje analýzy tak potvrzují předpoklad, že v česko-bavorském transektu dochází k rozsáhlé introgresi *Y musculus* na genetické pozadí poddruhu *M. m. domesticus*. Je tak patrné z rozdílu přechodu markeru na chromosomu X – *Foxp3* (Obr. 6) a přechodu diagnostického markeru pro chromosom Y (Obr. 7). Můj lokus 5036 se jeví jako diagnostický pro rozdělení poddruhů myši domácí. Jeho geografický vzor nejlépe

vystihuje rozdělení na čtyři klastry charakterizující areál výskytu *Y domesticus* (Obr. 8A), oblast introgresního trojúhelníku (Obr. 8B) a dva klastry pro oblast výskytu *M. m. musculus* (Obr. 8C a 8D). Ostatní zkoumané lokusy vykazují značně složité geografické vzory, které se těžko interpretují a vykazují jemnou strukturu v rámci tří analyzovaných oblastí. Lokus 5036 dokázal v porovnání výskytu jeho alel s variantami diagnostického lokusu pro *Y* získaného z dřívějších prací zařadit do stejné oblasti (*Y domesticus* a *Y musculus*) 504 jedinců z 522, u kterých byl znám diagnostický lokus pro *Y*.



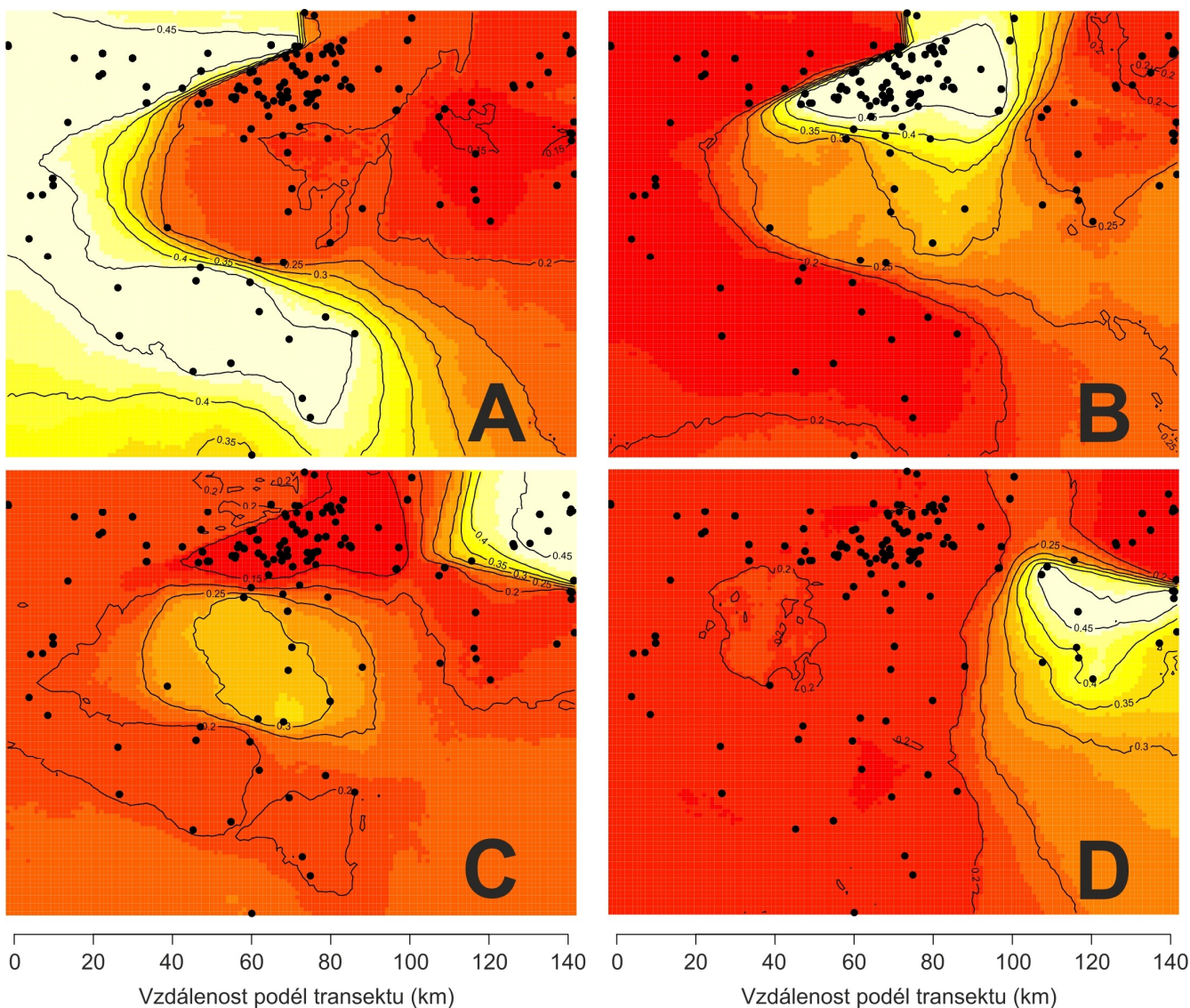
*Obr. 6: Mapa z programu Geneland pro lokus Foxp3. Místa s největší pravděpodobností výskytu klastru pro *M. m. domesticus* jsou světle žlutá, s nejnižší pravděpodobností červená. Černé linky označují místa se stejnou pravděpodobností výskytu.*



*Obr. 7: Mapa z programu Geneland pro markery na chromosomu Y. Místa s největší pravděpodobností výskytu klastru pro *M. m. domesticus* jsou světle žlutá, s nejnižší pravděpodobností červená. Černé linky označují místa se stejnou pravděpodobností výskytu.*

Výpočty počtu haplotypů specifických pro danou lokalitu a euklidovských vzdáleností mezi lokalitami se stejným haplotypem byly stanoveny pro zjištění populační struktury a migrace v rámci hybridní zóny. Ukázalo se, že většina haplotypů je pouze na jedné lokalitě (Obr. 9). To spolu s velkou variabilitou našich markerů (Tab. 1) umožňuje určit délku migrací mezi jednotlivými populacemi. Délka migrace je založena na předpokladu, že jedinec mající stejný haplotyp, jaký se vyskytuje i na jiné lokalitě, přišel právě z té druhé lokality. Pomímám fakt, že v mikrosatelitech může být velké procento konvergentních mutací, kterými mohl na dvou lokalitách vzniknout stejný haplotyp. Vzdálenost, kterou možní migranti uběhnou, je pak stanovena na Obr. 10. Celkem překvapivě, vzhledem k dosavadním znalostem migračních vzdáleností (shrnuje Pocock et al. 2005), vychází jako celkem běžná migrace do 30 kilometrů. Jedná se tak o zhruba 29 km delší přesuny

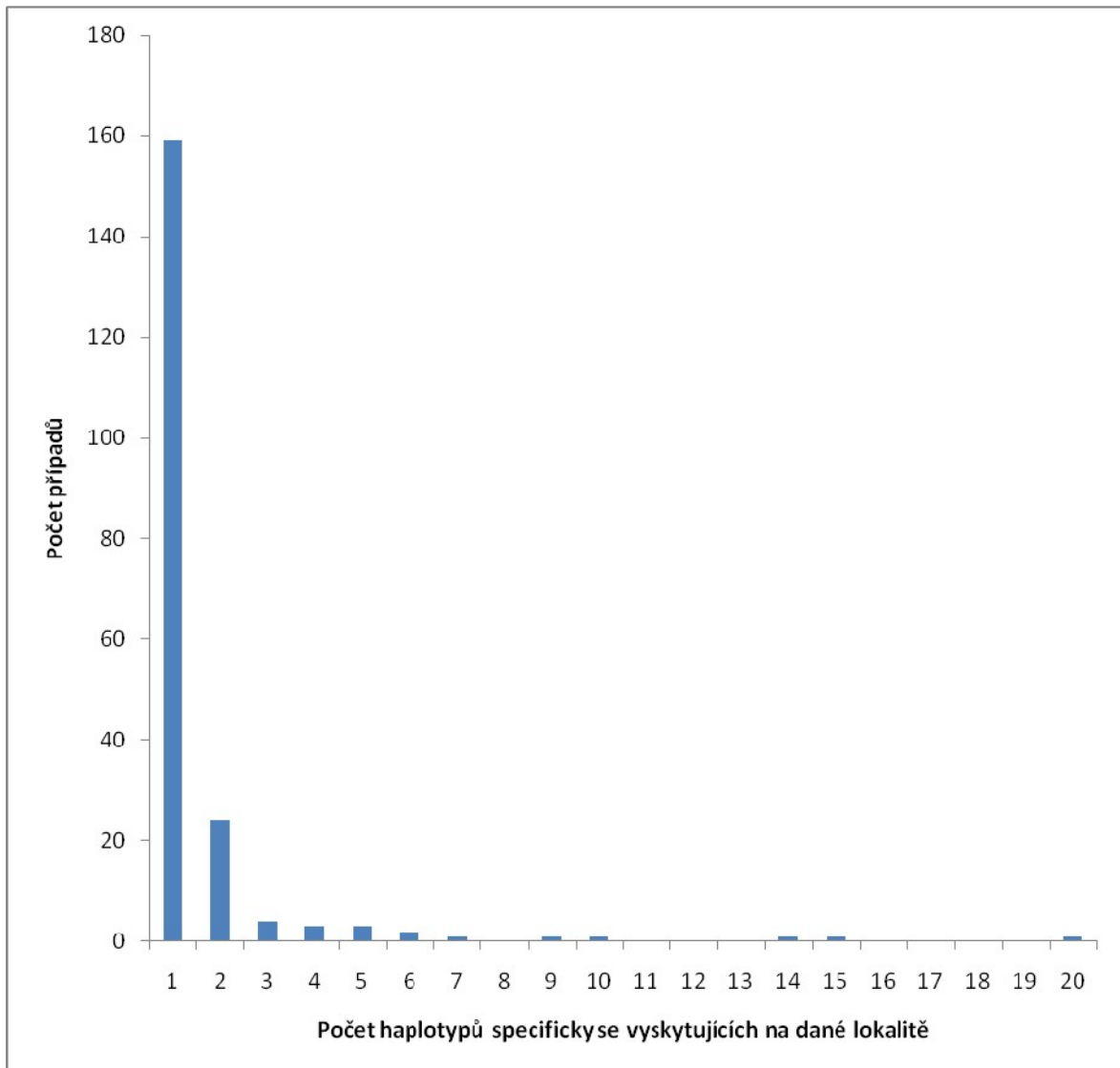
myších jedinců, než bylo dosud zaznamenáno. Vzdálenosti delší než 50 km se dají považovat za záměny vzorků, nebo případné transporty myších jedinců pomocí člověka.



Obr. 8: Mapa z Geneland pro lokus 5036. Místa s největší pravděpodobností výskytu daného klastru jsou světle žlutá, s nejnižší pravděpodobností červená. Černé linky označují místa se stejnou pravděpodobností výskytu.

Naše data poskytují i možnost sledovat změny haplotypů na lokalitách v průběhu let. Vzhledem k probíhajícímu dlouhodobému zkoumání hybridní zóny je pro mnoho našich lokalit k dispozici sada vzorků z různých let. Bohužel naše data nebyla pro takovou analýzu koncipována, a proto je nemožné použít na testování změn haplotypů na lokalitě v čase statistické metody. Nicméně z Tabulky A v příloze lze vyčíst, že z počtu 21 lokalit, které mají více jedinců než pět a zároveň tito jedinci pochází z minimálně dvou různých

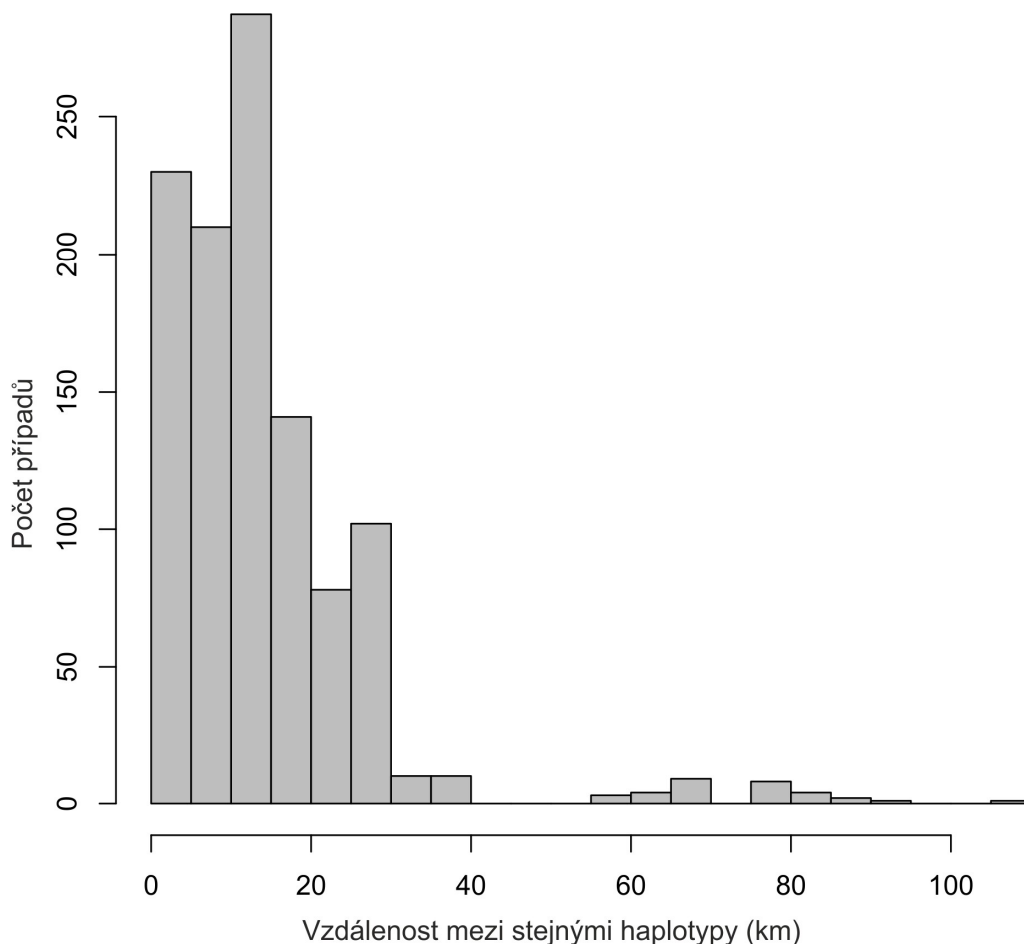
let, je na jedné 1 lokalitě stejný haplotyp i po deseti letech. Pouze na dvou lokalitách z celkového počtu 21 se vyměnil původní haplotyp do dvou let.



Obr. 9: Graf znázorňující počet haplotypů, které se vyskytují na daném počtu lokalit. Osa X je počet haplotypů specifických pro lokalitu. Osa Y je počet případů.

Ve statistickém testu zaměřeném na míru isolation by distance (izolace se vzdáleností) našich dat byla zjišťována míra vzájemné podobnosti sousedních lokalit ve srovnání s lokalitami vzdálenými. Nejprve však bylo třeba vypočítat statistický test AMOVA pro získání přehledu o variabilitě uvnitř a mezi populacemi (Příloha B). Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že variabilita uvnitř populací vysvětluje 47% z celkové variability. Variabilita mezi populacemi pak vysvětluje 53% z celku. Test vyšel vysoce průkazně. Z AMOVA pak byla stanovena matice párových hodnot R_{st} pro lokality. Výpočet R_{st} byl

opět průkazný $p < 0,001$. Testování míry isolation by distance splnilo předpoklad a test se ukázal jako průkazný - hodnota $p < 0,002$. Bylo tak možné sestavit stromy založené na genetických vzdálenostech mezi jednotlivými lokalitami.



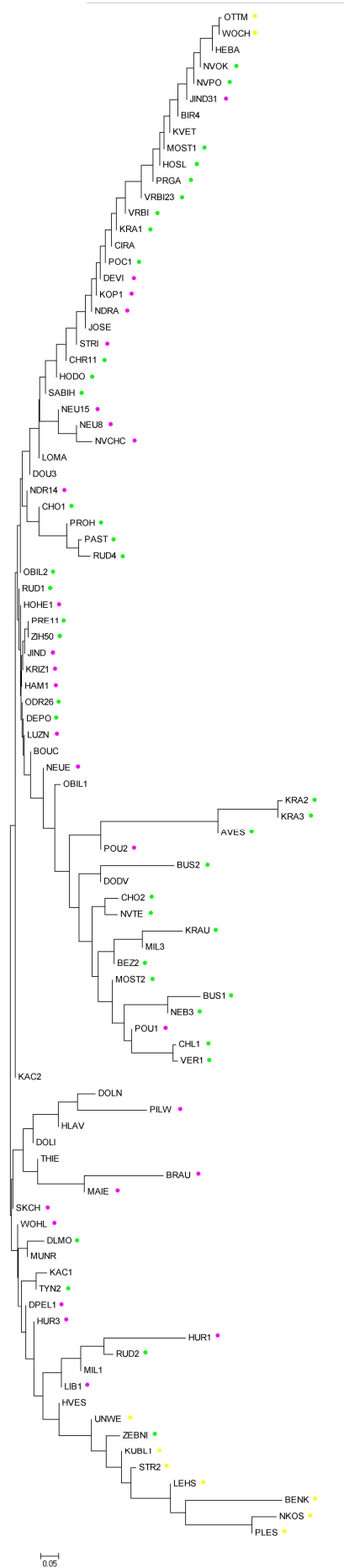
Obr. 10: Graf znázorňující vzdálenost mezi dvěma stejnými haplotypy na různých lokalitách. Osa X je vzdálenost v kilometrech mezi lokalitami se stejným haplotypem. Osa Y je počet případů.

Strom založený na Neighbor-Joining ukazuje vztahy podobnosti mezi lokalitami (Obr. 11). Předpokladem pro charakterizaci nedávné introgrese bylo vytvoření několika klastrů, z nichž jeden by odděloval *Y domesticus*, druhý oblast *M. m. musculus* a třetí, odvozený od této oblasti, by popisoval expanzi chromosomu *Y musculus* v introgressním trojúhelníku. Námí vytvořený strom klastruje všechny tyto skupiny dohromady v neustáleném pořadí. Oblast *Y domesticus* se například vyskytuje v počtu sedmi lokalit v jednom klastru (PLES, NKOS, BENK, LEHS, STR2, KUBL1 a UNWE), což by odpovídalo představám, ale druhá část této oblasti je v počtu tří lokalit (OTTM, WOCH, HEBA) na opačném konci

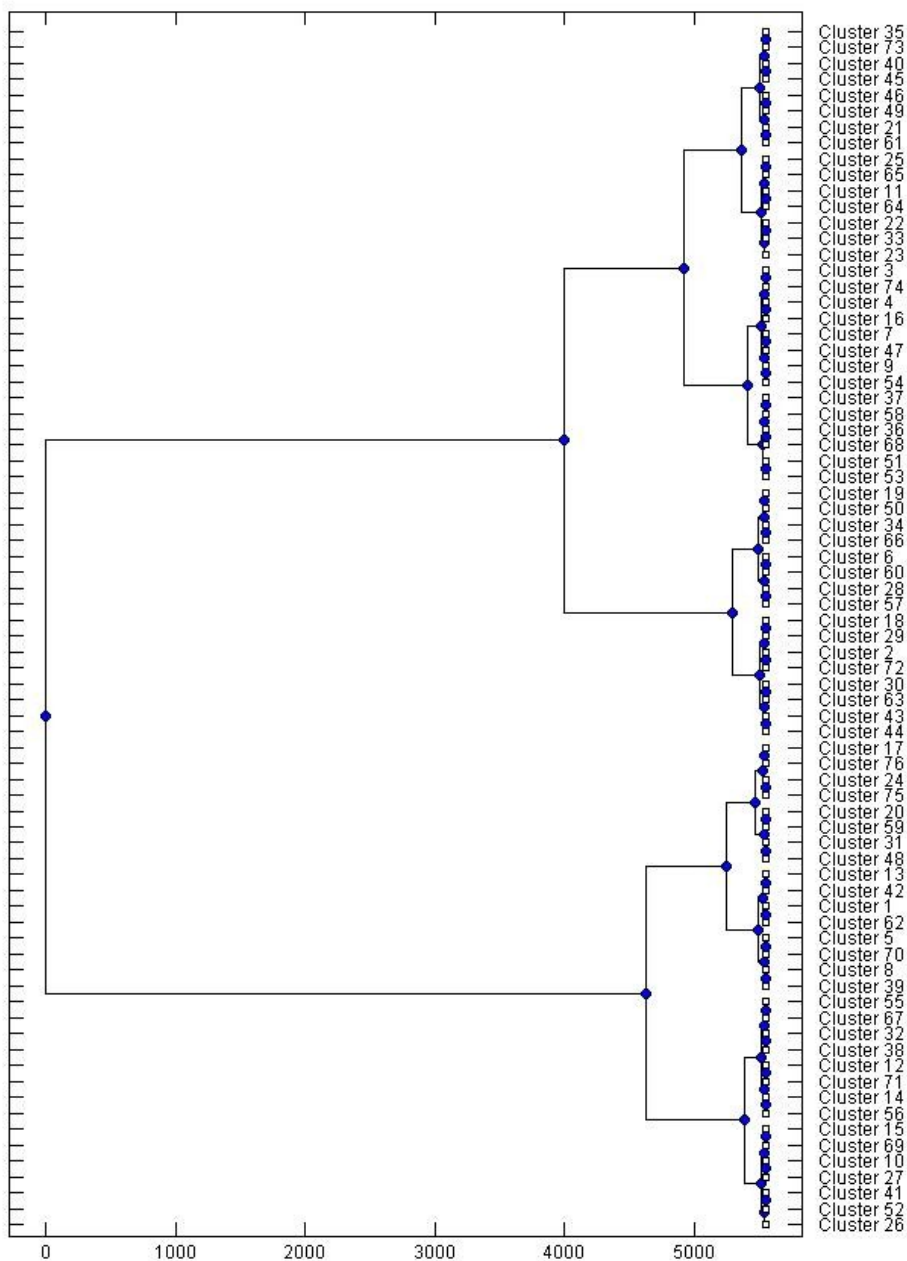
stromu. Mezi lokalitami s *Y musculus* se pak ve větším měřítku nedají rozlišit oblasti výskytu *Y musculus* a *Y musculus* v introgresním trojúhelníku.

Druhý námi vytvořený strom je místo na genetických vzdálenostech lokalit založen na haplotypech jedinců (Obr. 12). Je zpracován na základě identity alel bez znalosti jejich velikosti. Tento strom seřadil do jednoho klastru většinu jedinců s *Y domesticus*, mezi ně však zařadil tři lokality s výskytem *Y musculus* (PRE11, ZIH50, BUS2). Mezi ostatními jedinci z oblastí *Y musculus* a *Y musculus* v introgresní oblasti nelze vyčíst žádný podrobnější vzor. Jedinci přiřazení k lokalitám a příslušnému klastru jsou shrnuti v Příloze C.

Charakterizace variability ve všech třech oblastech (Tab. 7) byla provedena nejjednodušším možným způsobem. Podílem počtu haplotypů na počet lokalit. Předpokladem bylo, že variabilita uvnitř introgresního trojúhelníku bude snížena z důvodu tzv. efektu zakladatele. Náš předpoklad se nepotvrdil. Variabilita je nejnižší v oblasti *Y musculus* a nejvyšší u *Y domesticus*.



Obr. 11: Strom lokalit založený na metodě Neighbor-Joining. Žlutě označeny lokality *M. m. domesticus*, zeleně *M. m. musculus*, fialově lokality v introgresní oblasti.



Obr. 12: Strom založený na příbuznosti jedinců. Příloha C v přílohách znázorňuje příslušnost jedinců do jednotlivých klastrů.

Oblast	Počet lokalit	Počet haplotypů	Počet haplotypů na lokalitu
MM	45	53	1,17778
DyM	35	48	1,371429
DD	10	20	2

Tab. 7: Charakteristika variability v hybridní zóně. MM - oblast výskytu *M. m. musculus*, DyM - oblast introgresního trojúhelníku, DD - oblast výskytu *M. m. domesticus*

6 Diskuze

6.1 Mikrosatelitové markery

K porozumění disperze a variability chromosomu Y v hybridní zóně jsem nejprve musel vytvořit sadu mikrosatelitových markerů. Dosud byla zóna zkoumána pouze poddruhově diagnostickými markery na pohlavních chromosomech, autosomech a mtDNA (Munclinger et al. 2002; Bozikova et al. 2005; Macholan et al. 2007; Macholan et al. 2008; Macholan et al. 2011). Je až s podivem, že se na chromosom Y při analýzách populací v okolí kontaktu *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* zapomíná. Má totiž několik nesporných výhod. Předně je děděn pouze v samčí linii a může tak leccos napovědět o disperzi samců. Další neopomenutelnou výhodou je nepřítomnost rekombinace. Změny v haplotypech se tak dějí pouze mutacemi. Samčí chromosom je tedy předurčen k využití ve fylogeografických analýzách. Toho je v současné době využíváno v pracích zabývajících se disperzí lidí a jejich národů (Zheng et al. 2009; Montano et al. 2011). Naše mikrosatelitové markery použité na vyhodnocování dat z chromosomu Y myši domácí jsou dostatečně variabilní na to, aby dokázaly analyzovat evoluční historii a disperzi samců v hybridní zóně.

6.2 Pozice hybridní zóny

Analýza dat v programu Geneland byla provedena pro identifikaci pozice hybridní zóny a introgresního trojúhelníku. Pro stanovení středu zóny byl použit marker *Foxp3* obdobně jako v práci Macholan et al. (2011). Z analýzy vyplynula stejná pozice hybridní zóny, jaká byla identifikována i předchozími autory (Macholan et al. 2008). Odlišný vzor výskytu introgresní oblasti Y chromosomu *M. m. musculus*, než jaký byl prezentován v Macholan et al. (2008), je pravděpodobně dán výrazně menším počtem vzorků. Naše vzorky navíc nebyly primárně určeny k identifikaci introgresního trojúhelníku a lokality proto nejsou rozmístěny rovnoměrně po celé oblasti. Průnik Y musculus je však i tak dobře patrný.

Marker 5036 použitý v rámci sady mikrosatelitů je pravděpodobně i diagnostický, co se poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* týče. To dokazují analýzy z programu Geneland i srovnání s poddruhově diagnostickými markery použitými v předchozích pracích (Macholan et al. 2008). 5036 vykazuje i další struktury v rámci populace s Y *musculus*, včetně oblasti introgresního trojúhelníku.

6.3 Analýza sociální struktury

Běžně se předpokládá, že obrat myši na lokalitě je poměrně vysoký (Hauffe et al. 2000). Po vymření demu nastává rekolonizace během 1 až 2 generací, což při předpokladu, že myši mají zhruba 6 generací ročně (Pocock et al. 2004), znamená osídlení opuštěného habitatu do 4 měsíců. K rekolonizaci však dochází pouze omezeným počtem jedinců. V průměru dvěma samci, dvěma samicemi a dvěma nedospělými jedinci (Hauffe et al. 2000). To znamená, že taková nově vznikající populace bude s vysokou mírou pravděpodobnosti trpět takzvaným efektem zakladatele (founder effect) (Mayr 1944). Přichází-li na lokalitu pouze omezený počet jedinců, tak si s sebou nesou pouze omezené množství genetické diverzity své mateřské populace. V důsledku čehož bude na nové lokalitě patrně velmi snížena variabilita. To je i v souladu s mými daty. Na většině lokalit v česko-bavorském transektu hybridní zóny převládá jeden specifický haplotyp chromosomu Y pro danou lokalitu.

Svou roli v tomto vzoru rozložení haplotypů může sehrát i relativní uzavřenost myších populací. Demy jsou přísně hierarchické struktury a začlenění do nich je pro migranty značně obtížné. Dá se také počítat, že svůj vliv na uzavřenost populací bude mít i relativní přehlednost našich lokalit. Většina z nich je vázána na lidská obydlí, kde oproti podmínkám v přírodě panuje vyšší uspořádanost terénu a dominantní samci si lépe ohlírají svoje teritorium (Gray et al. 2000). Navíc pro převážnou většinu migrantů jsou k introdukování dosažitelné pouze demy v okolí (shrnuto v Pocock et al. 2005). To znamená, že šíří svůj genom jen v rámci populace. Moje vzorky jsou sbírány právě v rámci populací, nebo jejich částí, což objasňuje výskyt specifických haplotypů na dané lokalitě.

Přednesenému vysvětlení napovídají i další data z hybridní zóny. Většina lokalit si totiž podržela svůj unikátní haplotyp po dobu několika let. Při známé rychlé obměně demů svědčí tento fakt pro udržování populací jako dynamické struktury, kdy je vymřelý dem nahrazen migranty z jiného demu stejné populace a tedy i stejného haplotypu. Takto se haplotyp dokáže udržet na lokalitě i devět let. V rámci demu pak pravděpodobně dochází k neustálé obměně dominantních samců za jejich potomky. To je v souladu s pozorováním formování sociální struktury myši v aréně (Reimer a Petras 1967).

Haplotyp se na sledovaných lokalitách v rámci času změnil jen několikrát a to pravděpodobně díky dvěma efektům. Svou roli budou sehrávat mutace našich lokusů. Při předpokladu stepwise mutačního modelu (Hardouin et al. 2010), by mělo docházet v tomto případě ke změnám pouze o jednu jednotku opakování na některém z našich lokusů. To ale

vysvětluje jen malý počet případů z našich dat. Mnohem pravděpodobnější se zdá varianta introdukce migranta z jiné populace do některého demu na lokalitě. V některých případech pak může dojít i k ovládnutí celé populace migrantovým haplotypem kvůli driftu.

Díky mikrosatelitovým lokusům lze ve většině případů přiřadit samce na konkrétní lokalitu i v rámci jedné vesnice. To předurčuje moje markery pro analýzy disperze samců v rámci hybridní zóny.

Běžná migrační vzdálenost pro myš domácí je zhruba 30 metrů (shrnutí v Pocock et al. 2005). Nedosahuje tak dále, než v rámci jedné populace. Delší jsou migrace pouze při disturbancích. Nejdelší zaznamenané aktivní přesuny myši pak dosahují vzdáleností něco málo přes 500 metrů. Je proto překvapivé, že při mých analýzách vyšel jako běžný přesun do třiceti kilometrů. Důvodů, proč takto daleké migrace nebyly dosud zaznamenány, může být několik.

Obečně málo záznamů existuje o přesunech jedinců myši pomocí transportu s člověkem. Podíl těchto transportů na migraci však není vůbec zanedbatelný (Baker 1994). Je tedy možné, že přesuny myši, které jsou delší než oněch 500 metrů, odrážejí vlastně spíše než jejich disperzi pohyb člověka. Proč počet takových přesunů klesá s přibývajícím vzdáleností? Vysvětlení, může být založeno na faktu, že myši se pohybují společně s lidskými komoditami spíše než se samotným člověkem. Přesun sena a obilí se v lidské společnosti také děje v převážné většině případů jen na omezené vzdálenosti. Zda je ale takový rozdíl mezi transportem na vzdálenost 30 a 50 kilometrů se těžko odhaduje. Měření nebylo dosud provedeno.

Druhým vysvětlení takto daleké disperze samců může být mnohem větší podíl dalekých migrací, než se doposud myslelo. Většina experimentů v této oblasti byla totiž dělána metodou zpětného odchyty, který nízký počet dálkových migrantů vzhledem k omezenému počtu pastí nemusel zachytit. Vzhledem k členitosti terénu, který migranti museli překonat, je ale množství takových přesunů závažnější. Disperzi malých hlodavců v malém měřítku totiž výrazně ovlivňuje i pouhá cesta, kterou musejí překonat (Swihart a Slade 1984). Navíc se v mnohem větší míře pohybují přes nepřehlednější zarostlé území, než otevřené prostory (Lorenz a Barrett 1990). Při disperzi na dlouhé vzdálenosti museli takových bariér překonat hned několik.

Výzkum pomocí genetických markerů by v oblasti disperze jedinců myši domácí mohl hodně napovědět o dálkových migracích a toku genů v myších populacích na delší vzdálenosti.

6.4 Analýza introgresní oblasti

Teorie o vzniku introgrese chromosomu Y poddruhu *M. m. musculus* na genetické pozadí *M. m. domesticus* v důsledku intragenomického konfliktu předpokládá nedávnou expanzi v introgresní oblasti (Macholan et al. 2008). K jejímu pochopení tak může výrazněji přispět analýza historie pomocí molekulárních markerů na samčím chromosomu. Jednoduchý způsob, jak tak učinit, je pomocí stromů založených na genetických vzdálenostech mezi lokalitami ve studovaném transektu. Naše výsledky však naznačují, že k nedávné expanzi chromosomu Y nedošlo. Podporu našemu výsledku skýtá i provedený Mantelův test na izolaci se vzdáleností (isolation by distance), který nevyšel příliš přesvědčivě. Podobné mohou být v několika případech i lokality značně vzdálené, což vylučuje rychlou expanzi. Ovlivnit tento stav mohou i zpětné mutace, které se u mikrosatelitů nedají vyloučit. Variabilita mých mikrosatelitů je poměrně vysoká, proto předpoklad, že se díváme na velmi malou časovou škálu silně ovlivněnou zpětnými mutacemi, získává na významu. Díky tomu nejsme schopni analyzovat historii vývoje celé populace v česko – bavorském transektu. Na lokálních škálách představu o vývoji populací mít ale můžeme. Podíváme-li se například pouze na lokality s *M. m. domesticus* zjistíme, že většina populací tvoří jeden klast, kromě dvou populací na lokalitách OTTM a WOCH. Tyto populace jsou určeny jako vzájemně blízce příbuzné a zároveň odlišné od ostatních lokalit *M. m. domesticus*. Jejich příbuznost je podpořena i faktem, že se nalézají pouze dva kilometry od sebe. Možnosti analyzovat příbuzenské vztahy na lokální škále podporuje i strom založený na haplotypech jedinců. Jedinci *M. m. domesticus* se opět ukázali jako příbuzní, zatímco jedinci s introgresním Y *musculus* a *M. m. musculus* byli dáni dohromady. Podobným výsledkům dopomáhá i dynamická populační struktura myších populací. Změny v haplotypech jedinců a lokalit probíhají příliš rychle na to, aby je jednoduché modely dokázaly postihnout. K podrobným analýzám historie populací hybridní zóny by bylo tedy vhodné použít složitější modelování.

Předpoklad o nedávné expanzi v introgresním trojúhelníku by mohl být také charakterizován sníženou variabilitou uvnitř introgresní oblasti v důsledku efektu zakladatele. Tento stav se však nezdá být podporován našimi daty. K relevantnímu vyloučení hypotézy by nicméně bylo potřeba výrazně rozšířit počet prozkoumaných jedinců.

7 Závěr

Pomocí šesti mikrosatelitových markerů na chromosomu Y jsem analyzoval 689 jedinců ze 161 lokalit v česko-bavorském transektu hybridní zóny myši domácí. Sadou variabilních markerů jsem analyzoval jak populační strukturu myší, tak historii vzniku introgresní oblasti chromosomu Y. Většina haplotypů se vyskytovala pouze na jedné lokalitě, což svědčí o relativní uzavřenosti sociální struktury myší vůči migrantům z okolí. Migrace totiž podle mých dat nemusí být zastoupena v populaci myší pouze krátkou disperzí, jak se doposud myslelo, ale i relativně dlouhými migracemi. Toto odhalení si vysvětlují dvojím způsobem. Buď se myši na vzdálenosti přesahující jeden kilometr šíří za pomoci člověka, nebo je důvodem odhalení těchto migrací netradiční způsob jejich výzkumu. Pro analýzy historie vzniku introgrese chromosomu Y jsem použil jednoduché metody založené na genetických vzdálenostech mezi lokalitami i příbuznosti jedinců.

8 Použitá literatura

- Arnold M.** 1997. Natural hybridization and evolution. New York, Oxford, Oxford University Press.
- Baker AEM.** 1994. Stowaway transport rates of house mice (*mus-domesticus*) and deermice (*peromyscus-maniculatus*). Sixteenth Vertebrate Pest Conference:106-112.
- Baker AEM a Petras ML.** 1986. The fate of *mus-domesticus* demes after destruction of their habitats. *Biological Journal of the Linnean Society* 29(2):81-88.
- Barton NH a Gale KS.** 1993. Genetic-analysis of hybrid zones. 13-45 p.
- Barton NH a Hewitt GM.** 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* 16:113-148.
- Bazykin AD.** 1969. Hypothetical mechanism of speciation. *Evolution* 23(4):685-&.
- Boursot P, Auffray JC, Brittondavidian J a Bonhomme F.** 1993. The evolution of house mice. *Annu Rev Ecol Syst* 24:119-152.
- Bozikova E, Munclinger P, Teeter KC, Tucker PK, Macholan M a Pialek J.** 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *mus musculus musculus* and *mus musculus domesticus*: A comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):363-378.
- Bursell C.** 2011. Mouse stops us-bound sas flight in stockholm [online]. The Local Europe AB SE556667-4023 2011-08-16.
- Carlsen M.** 1993. Migrations of *mus-musculus-musculus* in danish farmland. *Zeitschrift Fur Saugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology* 58(3):172-180.
- Corander J a Tang J.** 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205(1):19-31.
- Coyne J a Orr H.** 2004. Speciation. Sinauer Associate, Inc, Sunderland,MA, USA.
- Coyne JA.** 1992. Genetics and speciation. *Nature* 355(6360):511-515.
- Dod B, Jermiin LS, Boursot P, Chapman VH, Nielsen JT a Bonhomme F.** 1993. Counterselection on sex-chromosomes in the *mus-musculus* european hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 6(4):529-546.
- Dod B, Smadja C, Karn RC a Boursot P.** 2005. Testing for selection on the androgen-binding protein in the danish mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):447-459.

- Fitzgerald BM, Karl BJ a Moller H.** 1981. Spatial-organization and ecology of a sparse population of house mice (*mus-musculus*) in a new-zealand forest. *Journal of Animal Ecology* 50(2):489-518.
- Frank SA.** 1991. Divergence of meiotic drive-suppression systems as an explanation for sex-biased hybrid sterility and inviability. *Evolution* 45(2):262-267.
- Gray SJ, Jensen SP a Hurst JL.** 2000. Structural complexity of territories: Preference, use of space and defence in commensal house mice, *mus domesticus*. *Animal Behaviour* 60:765-772.
- Guillot G, Mortier F a Estoup A.** 2005. Geneland: A computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Notes* 5(3):712-715.
- Haldane JBS.** 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12(2):101-109.
- Hardouin EA, Chapuis JL, Stevens MI, van Vuuren JB, Quillfeldt P, Scavetta RJ, Teschke M a Tautz D.** 2010. House mouse colonization patterns on the sub-antarctic kerguelen archipelago suggest singular primary invasions and resilience against re-invasion. *Bmc Evolutionary Biology* 10.
- Hauffe H, Pialek J a Searle JB.** 2000. The house mouse chromosomal hybrid zone in *valtellina* (so): A summary. Of past and present research. *Hystrix* 11(2):17 - 25.
- Hunt WG a Selander RK.** 1973. Biochemical genetics of hybridization in european house mice. *Heredity* 31(AUG):11-33.
- Hurst LD a Pomiankowski A.** 1991. Causes of sex-ratio bias may account for unisexual sterility in hybrids - a new explanation of haldanes rule and related phenomena. *Genetics* 128(4):841-858.
- Charlesworth B, Coyne JA a Barton NH.** 1987. The relative rates of evolution of sex-chromosomes and autosomes. *American Naturalist* 130(1):113-146.
- Jones CS, Noble LR, Jones JS, Tegelstrom H, Triggs GS a Berry RJ.** 1995. Differential male genetic success determines gene flow in an experimentally manipulated mouse-population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 260(1359):251-256.
- Krebs C.** 2003. How does rodent behaviour impact on population dynamics? In: Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM, eds *Rats, mice and people: rodent biology and management* ACIAR Monograph no 96 Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research:117 - 122.
- Kumar S, Nei M, Dudley J a Tamura K.** 2008. Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9(4):299-306.
- Lorenz GC a Barrett GW.** 1990. Influence of simulated landscape corridors on house mouse (*mus-musculus*) dispersal. *American Midland Naturalist* 123(2):348-356.

- Macholan M, Baird SJE, Dufkova P, Munclinger P, Bimova BV a Pialek J.** 2011. Assessing multilocus introgression patterns: A case study on the mouse x chromosome in central europe. *Evolution* 65(5):1428-1446.
- Macholan M, Baird SJE, Munclinger P, Dufkova P, Bimova B a Pialek J.** 2008. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *Bmc Evolutionary Biology* 8.
- Macholan M, Krystufek B a Vohralik V.** 2003. The location of the mus musculus/m-domesticus hybrid zone in the balkans: Clues from morphology. *Acta Theriologica* 48(2):177-188.
- Macholan M, Munclinger P, Sugerkova M, Dufkova P, Bimova B, Bozikova E, Zima J a Pialek J.** 2007. Genetic analysis of autosomal and x-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61(4):746-771.
- Macholan M a Zima J.** 1994. Mus-domesticus in western bohemia - a new mammal for the czech-republic. *Folia Zoologica* 43(1):39-41.
- Mayr E.** 1944. Systematics and the origin of species: From viewpoint of a zoologist. New York, Columbia University Press.
- Meiklejohn CD a Tao Y.** 2010. Genetic conflict and sex chromosome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 25(4):215-223.
- Montano V, Ferri G, Marcari V, Batini C, Anyaele O, Destro-Bisol G a Comas D.** 2011. The bantu expansion revisited: A new analysis of y chromosome variation in central western africa. *Molecular Ecology* 20(13):2693-2708.
- Munclinger P, Bozikova E, Sugerkova M, Pialek J a Macholan M.** 2002. Genetic variation in house mice (mus, muridae, rodentia) from the czech and slovak republics. *Folia Zoologica* 51(2):81-92.
- Munclinger P a Frynta D.** 2000. Social interactions within and between two distant populations of house mouse. *Folia Zoologica* 49(1):1-6.
- Orr HA.** 1996. Dobzhansky, bateson, and the genetics of speciation. *Genetics* 144(4):1331-1335.
- Panithanarak T, Hauffe HC, Dallas JF, Glover A, Ward RG a Searle JB.** 2004. Linkage-dependent gene flow in a house mouse chromosomal hybrid zone. *Evolution* 58(1):184-192.
- Payseur BA, Krenz JG a Nachman MW.** 2004. Differential patterns of introgression across the x chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* 58(9):2064-2078.
- Payseur BA, Krenz JG a Nachman MW.** 2005. Differential patterns of introgression across the x chromosome in a hybrid zone between two species of house mice (vol 59, pg 474, 2005). *Evolution* 59(2):474-474.

- Payseur BA a Nachman MW.** 2005. The genomics of speciation: Investigating the molecular correlates of x chromosome introgression across the hybrid zone between *mus domesticus* and *mus musculus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):523-534.
- Peakall R a Smouse PE.** 2006. Genalex 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6(1):288-295.
- Pocock MJO, Hauffe HC a Searle JB.** 2005. Dispersal in house mice. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):565-583.
- Pocock MJO, Searle JB a White PCL.** 2004. Adaptations of animals to commensal habitats: Population dynamics of house mice *mus musculus domesticus* on farms. *Journal of Animal Ecology* 73(5):878-888.
- Prager EM, Boursot P a Sage RD.** 1997. New assays for y chromosome and p53 pseudogene clines among east holstein house mice. *Mammalian Genome* 8(4):279-281.
- Prager EM, Sage RD, Gyllensten U, Thomas WK, Hubner R, Jones CS, Noble L, Searle JB a Wilson AC.** 1993. Mitochondrial-DNA sequence diversity and the colonization of scandinavia by house mice from east holsten. *Biological Journal of the Linnean Society* 50(2):85-122.
- Raufaste N, Orth A, Belkhir K, Senet D, Smadja C, Baird SJE, Bonhomme F, Dod B a Boursot P.** 2005. Inferences of selection and migration in the danish house mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):593-616.
- Reimer JD a Petras ML.** 1967. Breeding structure of house mouse *mus musculus* in a population cage. *Journal of Mammalogy* 48(1):88-&.
- Rieseberg LH, Whitton J a Gardner K.** 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152(2):713-727.
- Riginos C a Cunningham CW.** 2005. Local adaptation and species segregation in two mussel (*mytilus edulis* x *mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular Ecology* 14(2):381-400.
- Rowe FP, Taylor EJ a Chudley AHJ.** 1963. The numbers and movements of house-mice (*mus-musculus* l) in the vicinity of 4 corn-ricks. *Journal of Animal Ecology* 32(1):87-&.
- Sage RD, Atchley WR a Capanna E.** 1993. House mice as models in systematic biology. *Systematic Biology* 42(4):523-561.
- Slatkin M.** 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1):457-462.
- Stickel LF.** 1979. Population ecology of house mice in unstable habitats. *Journal of Animal Ecology* 48(3):871-887.

- Swihart RK a Slade NA.** 1984. Road crossing in sigmodon-hispidus and microtus-ochrogaster. *Journal of Mammalogy* 65(2):357-360.
- Tao Y, Xhen SN, Hartl DL a Laurie CC.** 2003. Genetic dissection of hybrid incompatibilities between drosophila simulans and d-mauritiana. I. Differential accumulation of hybrid male sterility effects on the x and autosomes. *Genetics* 164(4):1383-1397.
- Teeter KC, Thibodeau LM, Gompert Z, Buerkle CA, Nachman MW a Tucker PK.** 2010. The variable genomic architecture of isolation between hybridizing species of house mice. *Evolution* 64(2):472-485.
- Tucker PK, Sage RD, Warner J, Wilson AC a Eicher EM.** 1992. Abrupt cline for sex-chromosomes in a hybrid zone between 2 species of mice. *Evolution* 46(4):1146-1163.
- Turelli M a Orr HA.** 1995. The dominance theory of haldanes rule. *Genetics* 140(1):389-402.
- Turelli M a Orr HA.** 2000. Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* 154(4):1663-1679.
- Vanlerberghe F, Dod B, Boursot P, Bellis M a Bonhomme F.** 1986. Absence of y-chromosome introgression across the hybrid zone between mus-musculus-domesticus and mus-musculus-musculus. *Genetical Research* 48(3):191-197.
- Wu CI a Davis AW.** 1993. Evolution of postmating reproductive isolation - the composite nature of haldane rule and its genetic bases. *American Naturalist* 142(2):187-212.
- Zheng LH, Sun HM, Wang JW, Li SL, Bai J, Jin Y, Yu Y, Chen F, Jin L a Fu SB.** 2009. Y chromosomal str polymorphism in northern chinese populations. *Biological Research* 42(4):497-504.

9 Přílohy

Lokalita	Rok odchyty	Počet jedinců se stejným haplotypem	Lokus					
			5036	6132	7322	7419	5045	7245
BUS2	2003	3	78	145	175	206	117	150
BUS2	2008	11	82	149	175	217	109	150
BUS2	2009	3	82	149	175	217	109	150
BUS2		1	82	157	175	206	120	150
DOLN	1997	12	82	149	169	206	120	157
DOLN		1	82	154	181	219	124	160
DOLN	1999	2	82	154	172	208	117	147
DOLN		1	82	149	172	206	120	157
HOHE1	2007	1	82	149	175	206	120	160
HOHE1		1	82	149	181	227	124	157
HOHE1	2008	2	82	149	175	206	120	160
HOHE1		1	82	149	178	206	120	160
HOHE1		1	82	149	178	227	124	157
HOHE1	2009	2	82	149	175	206	120	157
HOHE1	2010	3	82	149	175	206	120	157
HOHE1		2	82	140	181	208	120	150
HOHE1		1	82	149	178	227	124	157
HUR1	2003	12	82	149	175	206	120	157
HUR1		4	82	149	175	206	120	160
HUR1	2007	2	82	149	175	206	120	157
HUR1	2008	2	82	149	175	206	120	157
JIND31	2009	2	82	149	184	221	124	160
JIND31	2010	4	82	149	184	221	124	160
KAC2	1999	2	82	140	184	208	120	150
KAC2		1	74	140	184	188	117	157
KAC2		1	82	154	184	221	124	160
KAC2		1	82	149	172	202	120	143
KAC2	2003	2	82	149	172	217	120	153
KAC2	2008	1	82	149	172	202	120	143
KAC2		1	82	149	172	217	120	153
KAC2	2009	2	82	149	172	217	120	153
LEHS	2008	4	74	154	175	190	117	150
LEHS	2010	2	74	154	175	190	117	153
LEHS		1	74	154	175	190	117	150
LUZN	1999	2	82	154	184	221	124	160
LUZN		1	82	154	172	208	117	147
LUZN	2000	2	82	149	169	215	120	150
LUZN		2	82	149	175	200	124	157
LUZN		1	86	154	175	217	120	160

LUZN		1	82	149	175	215	120	163
LUZN		1	82	157	184	217	120	147
LUZN	2001	2	82	149	169	206	120	157
LUZN	2003	1	82	140	184	208	120	150
LUZN		1	82	154	184	221	124	160
MIL1	2000	1	82	149	175	206	120	160
MIL1		1	82	149	172	202	120	143
MIL1		1	74	154	184	188	117	166
MIL1	2001	4	82	149	175	206	120	160
MOST2	2000	3	82	154	184	221	124	160
MOST2	2008	2	82	140	184	208	120	150
MOST2		1	82	154	184	221	124	160
NEB3	1999	2	82	149	172	212	120	147
NEB3	2000	2	82	154	184	221	124	160
NEB3		2	82	140	184	208	120	150
NEB3	2007	1	86	145	187	212	120	150
NEB3		1	82	154	184	221	124	160
NEB3	2009	5	82	154	184	221	124	160
NEB3	2010	5	82	154	184	221	124	160
NEB3		1	82	166	175	206	120	143
NEUE	1999	2	82	145	169	208	117	172
NEUE		2	82	154	172	208	117	147
NEUE		1	82	149	184	221	124	169
NEUE		1	82	140	184	208	120	150
NEUE		1	74	140	181	188	117	157
NEUE	2000	2	82	166	175	219	120	143
NEUE		1	82	149	184	221	124	169
NEUE	2001	2	82	149	184	221	124	169
OBIL2	2008	4	82	149	172	202	120	143
OBIL2		3	82	154	184	221	124	160
OBIL2		2	82	140	181	208	120	150
OBIL2		1	82	154	181	221	124	160
OBIL2	2010	3	82	140	181	208	120	150
PLES	1996	1	82	145	181	210	120	147
PLES		1	82	154	181	214	124	163
PLES		1	74	140	181	188	117	157
PLES	1997	35	74	140	181	188	117	157
PLES		1	82	145	181	210	120	147
PLES		1	82	157	154	212	120	143
PLES	1999	5	74	140	181	188	117	157
PLES		1	82	154	172	208	117	147
POU1	1997	3	82	154	184	219	124	160
POU1		1	82	140	163	208	124	147
POU1	1999	1	82	154	184	221	124	160

POU1		1	82	149	169	210	120	143
POU2	1999	1	82	140	163	208	124	147
POU2		1	82	162	154	212	120	143
POU2	2008	4	82	154	184	221	124	160
PRGA	2008	4	86	149	169	214	120	157
PRGA	2010	4	86	149	169	214	120	157
RUD2	1999	1	78	140	172	206	120	160
RUD2		1	74	145	169	208	113	160
RUD2		1	74	145	169	208	113	157
RUD2	2003	7	82	149	175	206	120	157
STR2	2000	3	82	166	175	219	120	143
STR2		1	82	154	172	208	120	153
STR2	2003	2	74	154	172	192	117	163
STR2		2	74	149	172	188	117	157
STR2		1	74	154	172	192	117	166
STR2	2007	4	74	154	172	192	117	163
STR2		1	74	154	172	192	117	160
STR2	2008	4	74	154	172	192	117	163
STR2	2010	4	74	154	172	192	117	163
STR2		1	74	154	178	192	117	166
STR2		1	74	149	172	192	117	166
THIE	1997	2	74	149	169	190	117	163
THIE		1	82	149	178	217	124	147
THIE		1	82	149	178	217	124	166
THIE	1999	2	82	149	175	206	120	157
THIE		1	82	154	184	223	124	160
WOHL	2007	1	78	149	184	208	120	147
WOHL		1	82	145	166	208	117	160
WOHL	2010	2	82	145	166	208	117	166
WOHL		1	82	140	181	206	120	147

Příloha A: Tabulka ilustrující změnu haplotypů na lokalitě v čase. Zahrnuty byly pouze lokality s počtem odchycených samců více jak pět a to v minimálně dvou různých letech.

Variabilita mezi populacemi	53%
Variabilita uvnitř populací	47%
Celkem	100%

	Hodnota	p(náhoda >= data)
PhiPT	0,525	0,0001

Příloha B: Výsledek testu AMOVA.

Klastr	Pořadové číslo	Kód lokality	Oblast
Cluster 35	106	DOU2	
	122	HLAV	
	149	HVES	
	384	NDR14	DyM
	485	PLES	DyM
	494	POU1	DyM
	505	POU2	DyM
Cluster 73	589	VRBI	MM
	590	VRBI	MM
	591	VRBI23	MM
	592	VRBI23	MM
	593	VRBI23	MM
	696	NEB3	MM
	697	CHL1	M
Cluster 40	276	LIPOV	
	436	PILW	DyM
	437	PILW	DyM
	664	L70A	
Cluster 45	25	BRAU	DyM
	26	BRAU	DyM
	27	BRAU	DyM
	28	BRAU	DyM
	29	BRAU	DyM
	30	BRAU	DyM
	435	PILW	DyM
	657	MUNR	DyM
Cluster 46	260	KUBL1	DD
	572	THIE	
	605	WOHL	DyM
	606	WOHL	DyM
	655	WOHL	DyM

	656	BRAU	DyM
Cluster 49	645	L9DL	
	646	L9DL	
	647	LG15	
	648	LVNK	
	649	L70A	
	661		
	662	L1G4	
	663	LQY5	
Cluster 21	208	KAC1	
	337	NEUE	DyM
	338	NEUE	DyM
	339	NEUE	DyM
Cluster 61	541	STHR7	DyM
	658	MAIE	DyM
	659	MAIE	DyM
	660	MAIE	DyM
Cluster 25	123	HODO	MM
	124	HODO	MM
	248	KRASIK	MM
	255	KRIZ1	DyM
	484	PLES	DyM
Cluster 65	13	BEZ2	MM
	83	DOZ3	MM
	319	NEB3	MM
	431	PAST	MM
	434	PERNA	MM
	607	ZEBNI	MM
Cluster 11	604	WOHL	DyM
	650	MUNR	DyM
	651	MUNR	DyM
	652	L2E8	
Cluster 64	291	LUZN	DyM
	301	MLYN49	DyM
	481	PLES	DyM
	482	PLES	
Cluster 22	34	BUS3	MM
	58	DLMO	M
	126	HOHE1	DyM
	127	HOHE1	DyM
	302		
	303		
	335	NEUE	DyM
	349	NEU15	DyM
	350	NEU15	DyM

	351	NEU8	DyM
	352	NEU8	DyM
	353	NEU8	DyM
	389	OBIL1	MM
	390	OBIL1	MM
	391	OBIL1	MM
	408	OBIL2	MM
	409	OBIL2	MM
	410	OBIL2	MM
	411	OBIL2	MM
	412	OBIL2	MM
	519	PROH	MM
Cluster 33	121	HLAV	
	536	RUD4	MM
	568	SABIH	MM
	569	SABIH	MM
Cluster 23	59	DLMO	M
	60	DLMO	M
	65	DOLI	
	72	DODV	
	102	DOU3	
	103	DOU3	
	104	DOU3	
	147	HVES	
	148		
	179	CHO1	M
	205	KAC2	
	206	KAC1	
	207	KAC1	
	217	KAC2	
	218	KAC2	
	252	KRIZ1	DyM
	279	LUZN	DyM
	315	NEB3	MM
	316	NEB3	MM
	336	NEUE	DyM
	355	NVCHC	DyM
	356	NVCHC	DyM
	357	NVCHC	DyM
	358	NVCHC	DyM
	359	NVCHC	DyM
	360	NVCHC	DyM
	361	NVCHC	DyM
	377	NDR14	DyM
	378	NDR14	DyM

	392	OBIL1	MM
	393	OBIL1	MM
	394	OBIL1	MM
	653	MOST2	MM
	654	MOST2	MM
Cluster 3	55	DEPO	M
Cluster 74	432	PAST	MM
	433	PAST	MM
	694	LD1M	
Cluster 4	11	BEZ2	MM
	17	BLAZI	MM
Cluster 16	488	POC1	MM
	489	POC1	MM
	608	ZEBNI	MM
Cluster 7	21	BOUC	
	53	DEPO	M
	54	DEPO	M
	522	RUD1	MM
	523	RUD1	MM
	534	RUD3	MM
	535	RUD4	MM
	540	SSED	MM
	683	RUD4	MM
	693	BUS2	MM
Cluster 47	491	PROH	MM
	492	PROH	MM
Cluster 9	292	LUZN	DyM
	586	VER1	MM
	587	VER1	MM
Cluster 54	191	CHR11	M
	192	CHR11	M
	644	BUS2	MM
Cluster 37	50	BUS5	MM
	61	DLMO	M
	62	DLMO	M
	151	HVES	
	286	LUZN	DyM
	508	PRE11	MM
	578	TYN2	MM
	611	ZIH50	MM
Cluster 58	282	LUZN	DyM
	283	LUZN	DyM
	419	ODR26	MM
	420	ODR26	MM
	421	ODR26	MM

	517	PRPR	MM
Cluster 36	12	BEZ2	MM
	136	HOHE1	DyM
	137	HOHE1	DyM
	251	KRSOV	MM
	277	LOMA	
	278	LOMA	
	284	LUZN	DyM
	285	LUZN	DyM
	678	HOHE1	DyM
Cluster 68	114	HAM1	DyM
	575	THIE	
	576	THIE	
Cluster 51	174	CHL1	M
	175	CHL1	M
	176	CHL1	M
	177	CHL1	M
	178	CHL1	M
	220	KAC2	
	221	KAC2	
	224	KAC2	
	225	KAC2	
	670	KRAU	MM
	671	KAC2	
	677	CHL1	M
Cluster 53	37	BUS2	MM
	38	BUS2	MM
	39	BUS2	MM
	40	BUS2	MM
	41	BUS2	MM
	42	BUS2	MM
	43	BUS2	MM
	44	BUS2	MM
	45	BUS2	MM
	46	BUS2	MM
	47	BUS2	MM
	48	BUS2	MM
	49	BUS2	MM
	675	BUS2	MM
	676	BUS2	MM
Cluster 19	363	NVPO	MM
	364	NVPO	MM
	365	NVPO	MM
	366	NVPO	MM
	367	NVPO	MM

	368	NVPO	MM
	369	NVPO	MM
	370	NVOK	MM
	371	NVOK	MM
	372	NVOK	MM
	373	NVTE	MM
	684	MAIE	DyM
Cluster 50	1	AVES	M
	2	AVES	M
	71	DOLI	
	152	HRE1	
	186	CHO1	M
	187	CHO1	M
	237	KRA2	MM
	238	KRA2	MM
	239	KRA2	MM
	240	KRA2	MM
	241	KRA2	MM
	244	KRA3	MM
	245	KRA3	MM
	246	KRA3	MM
	247	KRA3	MM
Cluster 34	138	HOSL	MM
	139	HOSL	MM
	140	HOSL	MM
	141	HOSL	MM
	142	HOSL	MM
	197	JIND	DyM
	681	HRZI	
Cluster 66	324	NEB3	MM
	347	NEUE	DyM
	348	NEUE	DyM
	543	STR2	DD
	544	STR2	DD
	545	STR2	DD
Cluster 6	66	DOLI	
	85	DOLN	
	86	DOLN	
	87	DOLN	
	88	DOLN	
	89	DOLN	
	90	DOLN	
	91	DOLN	
	92	DOLN	
	93	DOLN	

	94	DOLN	
	95	DOLN	
	96	DOLN	
	253	KRIZ1	DyM
	280	LUZN	DyM
	281	LUZN	DyM
	395	OBIL1	MM
	396		
	665	LUZN	DyM
Cluster 60	51	CIRA	
	52	CIRA	
	67	DOLI	
	97	DOLN	
	275	LIPOL	
	669	DODV	
Cluster 28	69	DOLI	
	81	DPEL1	DyM
	82	DPEL1	DyM
	110	HAM1	DyM
	111	HAM1	DyM
	112	HAM1	DyM
	113	HAM1	DyM
	125	HOHE2	DyM
	128	HOHE1	DyM
	129	HOHE1	DyM
	130	HOHE1	DyM
	131	HOHE1	DyM
	132	HOHE1	DyM
	150	HVES	
	153	HUR1	DyM
	154	HUR1	DyM
	155	HUR1	DyM
	156	HUR1	DyM
	157	HUR1	DyM
	158	HUR1	DyM
	159	HUR1	DyM
	160	HUR1	DyM
	161	HUR1	DyM
	162	HUR1	DyM
	163	HUR1	DyM
	164	HUR1	DyM
	169	HUR1	DyM
	170	HUR1	DyM
	171	HUR1	DyM
	172	HUR3	DyM

	173	HUR3	DyM
	193	JIND	DyM
	194	JIND	DyM
	195	JIND	DyM
	196	JIND	DyM
	272	LIB1	DyM
	273	LIB1	DyM
	398	OBIL1	MM
	520	RUD1	MM
	527	RUD2	MM
	528	RUD2	MM
	529	RUD2	MM
	530	RUD2	MM
	531	RUD2	MM
	532	RUD2	MM
	533	RUD2	MM
	573	THIE	
	574	THIE	
	672	HUR1	DyM
	673	HUR1	DyM
Cluster 57	68	DOLI	
	120	HLAV	
	133	HOHE1	DyM
	134	HOHE1	DyM
	135	HOHE1	DyM
	165	HUR1	DyM
	166	HUR1	DyM
	167	HUR1	DyM
	168	HUR1	DyM
	295	MIL1	
	296	MIL1	
	297	MIL1	
	298	MIL1	
	299	MIL1	
	379	NDRA	DyM
	380	NDRA	DyM
	381	NDRA	DyM
	382	NDRA	DyM
	383	NDRA	DyM
	609	ZIHL	MM
	674	HOHE1	DyM
Cluster 18	19	BOUC	
	20	BOUC	
	105	DOU3	
	188	CHO2	M

	215	KAC1	
	226	KLES	DyM
	317	NEB3	MM
	318	NEB3	MM
	487	POC2	MM
Cluster 29	70	DOLI	
	98	DOLN	
	99	DOLN	
	203	JOSE	
	204	JOSE	
	242	KRA20	MM
	287	LUZN	DyM
	345	NEUE	DyM
	346	NEUE	DyM
	483	PLES	
	490	PROH	MM
	542	STR2	DD
	682	JOSE	
Cluster 2	74	DODV	
	75	DODV	
	76	DODV	
	77	DODV	
	79	DODV	
	80	DODV	
	234	KRA1	MM
	235	KRA1	MM
	236	KRA2	MM
	243	KRA3	MM
	300	MIL3	
	690	DOU3	
Cluster 72	261	KVET	
	262	KVET	
	263	KVET	
	691	KVET	
	692	KVET	
Cluster 30	84	DOLN	
	146	HVES	
	493	POU1	DyM
	502	POU2	DyM
Cluster 63	374	NVTE	MM
	375	NVTE	MM
	376	NVTE	MM
	615		
	616	LTZH	
Cluster 43	430	PAST	MM

	610	ZIH133	MM
	679	PAST	MM
Cluster 44	227	KOP1	DyM
	228	KOP1	DyM
	229	KOP1	DyM
	230	KOP1	DyM
	231	KOP1	DyM
	232	KOP1	DyM
	580	TYN2	MM
	603	WOHL	DyM
	643	WOHL	DyM
Cluster 17	18	BOUC	
	180	CHO1	M
	181	CHO1	M
	182	CHO1	M
	183	CHO1	M
	209	KAC1	
	210	KAC1	
	211	KAC1	
	212	KAC1	
	213	KAC1	
	214	KAC1	
	219	KAC2	
	223	KAC2	
	294	MIL1	
	304		
	305	MOST2	MM
	362	NVCHC	DyM
	397	OBIL1	MM
	413	OBIL2	MM
	414	OBIL2	MM
	666	KOP37	DyM
	667	OBIL2	MM
	668	OBIL2	MM
Cluster 76	249	KRAU	MM
	250	KRAU	MM
	509	PRGA	MM
	510	PRGA	MM
	511	PRGA	MM
	512	PRGA	MM
	513	PRGA	MM
	514	PRGA	MM
	515	PRGA	MM
	516	PRGA	MM
	698	PRGA	MM

	699	PRGA	MM
Cluster 24	56	DEVI	DyM
	57	DEVI	DyM
	184	CHO1	M
	185	CHO2	M
	189	CHO2	M
	190	CHO2	M
Cluster 75	109	HABA	MM
	526	RUD2	MM
	566	STRI	DyM
	567	STRI	DyM
Cluster 20	198	JIND31	DyM
	199	JIND31	DyM
	200	JIND31	DyM
	201	JIND31	DyM
	202	JIND31	DyM
	274	LIB2	DyM
	340	NEUE	DyM
	341	NEUE	DyM
	342	NEUE	DyM
	343	NEUE	DyM
	344	NEUE	DyM
	399	OBIL1	MM
	680	JIND31	DyM
Cluster 59	22	BOUC	
	23	BOUC	
	35	BUS1	MM
	73	DODV	
	78	DODV	
	115	HAZHO	DyM
	222	KAC2	
	256	KRIZ2	DyM
	288	LUZN	DyM
	289	LUZN	DyM
	290	LUZN	DyM
	306	MOST2	MM
	307	MOST2	MM
	308	MOST2	MM
	309	MOST1	MM
	310	MOST1	MM
	311	MOST1	MM
	312	MOST2	MM
	313	MOST2	MM
	314	NEB2	
	320	NEB3	MM

	321	NEB3	MM
	322	NEB3	MM
	323	NEB3	MM
	325	NEB3	MM
	326	NEB3	MM
	327	NEB3	MM
	328	NEB3	MM
	329	NEB3	MM
	330	NEB3	MM
	331	NEB3	MM
	332	NEB3	MM
	400	OBIL1	MM
	401	OBIL1	MM
	402	OBIL1	MM
	403	OBIL1	MM
	404	OBIL1	MM
	405	OBIL1	MM
	406	OBIL1	MM
	407	OBIL1	MM
	416	OBIL2	MM
	417	OBIL2	MM
	418	OBIL2	MM
	422	ODR26	MM
	499	POU1	DyM
	500	POU15	DyM
	503	POU2	DyM
	504	POU2	DyM
	538	SKCH	DyM
	686	MIL3	
	687	NEB3	MM
	688	POU2	DyM
	689	POU2	DyM
Cluster 31	100	DOLN	
	254	KRIZ1	DyM
	415	OBIL2	MM
	579	TYN2	MM
	685	NEB3	MM
Cluster 48	116	HAZSH	DyM
	495	POU1	DyM
	496	POU1	DyM
	497	POU1	DyM
	498	POU1	DyM
	577	THIE	
Cluster 13	3	BENK	D
	4	BENK	D

	5	BENK	D
	6	BENK	D
	7	BENK	D
	8	BENK	D
	333	NDRF	
Cluster 42	423	OTTM	DD
	424	OTTM	DD
	425	OTTM	DD
	426	OTTM	DD
	427	OTTM	DD
	428	OTTM	DD
	429	OTTM	DD
Cluster 1	506	PRE11	MM
	507	PRE11	MM
	612	ZIH50	MM
	613	ZIH50	MM
	614	ZIH50	MM
	695	PRE11	MM
Cluster 62	31	BUS2	MM
	32	BUS2	MM
	33	BUS2	MM
	233	KOZL	MM
Cluster 5	257	KUBL1	DD
	258	KUBL1	DD
	700	L7UT	
Cluster 70	265	LEHS	DD
	266	LEHS	DD
	267	LEHS	DD
	268	LEHS	DD
	269	LEHS	DD
	270	LEHS	DD
	271	LEHS	DD
Cluster 8	548	STR2	DD
	549	STR2	DD
	550	STR2	DD
	551	STR2	DD
	556	STR2	DD
	557	STR2	DD
	558	STR2	DD
	559	STR2	DD
	560	STR2	DD
	561	STR2	DD
	562	STR2	DD
	563	STR2	DD
	564	STR2	DD

	565	STR2	DD
Cluster 39	259	KUBL2	DD
	518	RIEG	DD
	552	STR2	DD
	553	STR2	DD
	554	STR2	DD
	555	STR2	DD
	641	UNWE	DD
Cluster 55	14	BIR4	
	15	BIR4	
	16	BIR4	
	627	BIR2	
Cluster 67	583	UNWE	DD
	584	UNWE	DD
	633	L09X	
	634	L5CH	
	635	L5CH	
Cluster 32	36	BUS1	MM
	107	FRIE09	DD
	264	LEHS	DD
	618	LGKS	
	619	LGKS	
	620	LGKS	
Cluster 38	521	RUD1	MM
	524	RUD2	MM
	525	RUD2	MM
	581	UNWE	DD
	582	UNWE	DD
Cluster 12	624	L89S	
	625	LK8R	
	626	LK8R	
Cluster 71	622	L5CH	
	623	L5CH	
	639	LVNK	
Cluster 14	9	BENK	D
	101	DOU3	
	117	HEBA	
	118	HEBA	
	119	HEBA	
	621	LKAU	
	638	LOAS	
	640	LCRU	
Cluster 56	24	BRAU	DyM
	63	DOLI	
	642	LR8G	

Cluster 15	10	BENK	D
	585	UNWE	DD
	588	VRB7	MM
Cluster 69	145	HVES	
	486	PLOSB	
	570	THIE	
	571	THIE	
	629	LVZM	
	630	LVZM	
	631	LVZM	
Cluster 10	632	LVZM	
	595	WOCH	DD
	596	WOCH	DD
	597	WOCH	DD
	598	WOCH	DD
	599	WOCH	DD
	600	WOCH	DD
	601	WOCH	DD
Cluster 27	602	WOCH	DD
	636	LK3H	
	108	GROSS	DD
	546	STR2	DD
	547	STR2	DD
Cluster 41	628	LXN6	
	144	HVES	
	216	KAC2	
	354	NVCHC	DyM
	386	NKOS	DD
	387	NKOS	DD
	539	SPAL	DyM
Cluster 52	617	LB59	
	293	MIL1	
	388	NKOS	DD
Cluster 26	594	WEIC22	DD
	637	L6QM	
	64	DOLI	
Cluster 26	143		
	334	NEUE	DyM
	385	NKOS	DD
	438	PLES	DD
	439	PLES	DD
	440	PLES	DD
	441	PLES	DD
	442	PLES	DD
	443	PLES	DD

444	PLES	DD
445	PLES	DD
446	PLES	DD
447	PLES	DD
448	PLES	DD
449	PLES	DD
450	PLES	DD
451	PLES	DD
452	PLES	DD
453	PLES	DD
454	PLES	DD
455	PLES	DD
456	PLES	DD
457	PLES	DD
458	PLES	DD
459	PLES	DD
460	PLES	DD
461	PLES	DD
462	PLES	DD
463	PLES	DD
464	PLES	DD
465	PLES	DD
466	PLES	DD
467	PLES	DD
468	PLES	DD
469	PLES	DD
470	PLES	DD
471	PLES	DD
472	PLES	DD
473	PLES	DD
474	PLES	DD
475	PLES	DD
476	PLES	DD
477	PLES	DD
478	PLES	DD
479	PLES	DD
480	PLES	DD
501	POU2	DyM
537	SKCH	DyM

Příloha C: Zařazení jedinců do klastrů k Obr.12. DD – oblast domesticus, MM – oblast musculus, DyM – oblast introgresního trojúhelníku