

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Iva Kulichová**

Mutační rychlosti a šíření lidských populací  
Mutation rates and dispersal of human populations

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

doc. Mgr. Viktor Černý, Dr.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2014

Podpis

**Poděkování:**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Viktorovi Černému, Dr. za pomoc a cenné rady při vypracovávání této bakalářské práce. Dále pak děkuji své rodině a blízkému okolí za podporu a dobré zázemí pro studium.

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá odhadem mutační rychlosti DNA a jejím využitím na datování prvního osídlení Sahulu (Austrálie a Nové Guineje). V první části popisuje přímý postup pro odhad mutační rychlosti, který je založen na analýze rodokmenů a nepřímý postup založený na fylogenetické analýze. Zde jsou uvedeny i možné slabiny těchto dvou postupů, které skreslují výsledné hodnoty mutační rychlosti a proto je nutné je neopomíjet. Dále jsou popsány různé alternativy kalibrace přímého a nepřímého postupu pro odhad mutační rychlosti založené například na archeologických vzorcích. Následující část pojednává o charakteristických mutačních rychlostech mitochondriální a jaderné DNA odhadnutých přímým a nepřímým postupem. Rozdíl mezi rodokmenovou a fylogenetickou rychlostí je zejména u mitochondriální DNA, kde je připisován hlavně působení selekce. V druhé části práce je nastíněna evoluční cesta vedoucí k vzniku anatomicky moderního člověka na území Afriky a jeho rozšíření do Eurasie založené na fosilních nálezech datovaných před 45 000 lety. Zvláštní pozornost je věnována osídlování Sahulu a to z hlediska archeologického i molekulárního. Na základě kombinace těchto zdrojů informací se práce přiklání k názoru, že osídlení Sahulu proběhlo z Afriky podél jižního pobřeží Asie před 50 000 – 60 000 lety.

## **Klíčová slova**

mutační rychlost, sekvenční divergence, Austrálie, Nová Guinea, Sahul, archeologické nálezy

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with estimation of mutation rate of DNA and its use for dating of the first settlement of Sahul. The first part describes direct approach for the estimation of the mutation rate, based on the analysis of pedigrees and indirect approach based on phylogenetic analysis. The weaknesses of these methods are presented as well, as they distort the resulting values of the mutation rate and therefore it is necessary not to ignore them. Some alternatives of calibration methods for the direct and the indirect estimation of the mutation rate are introduced, for example based on archaeological samples. The subsequent section discusses the characteristic mutation rate of mitochondrial and nuclear DNA estimated utilising the direct and the indirect approach. The difference between pedigree and phylogenetic rates appears especially in the mitochondrial DNA, because of selection. The second part outlines the evolutionary path leading to anatomically modern human in Africa and his expansion into Eurasia based on the fossil record dated 45,000 years ago. Particular attention is paid to the settlement of Sahul in archaeological and molecular point of view. Based on the combination of these sources of information, it is possible to conclude that the settlement of Sahul passed from Africa along the southern coast of Asia in range of 50 000 - 60 000 years ago.

## **Keywords:**

mutation rate, sequence divergence, Australia, New Guinea, Sahul, archaeological excavation

## Obsah:

1. Úvod .....	1
2. Odhad mutační rychlosti.....	2
2.1. Obecné problémy s odhadem mutační rychlosti.....	2
2.2. Metody odhadu mutační rychlosti.....	4
2.2.1. Přímý postup pro odhad mutační rychlosti.....	4
2.2.2. Nepřímý postup pro odhad mutační rychlosti.....	4
2.2.3. Slabiny přímého postupu odhadu mutační rychlosti.....	5
2.2.4. Slabiny nepřímého postupu odhadu mutační rychlosti.....	6
2.3. Kalibrace odhadu mutační rychlosti.....	8
2.4. Mutační rychlost mitochondriální DNA.....	10
2.4.1. Určení časů divergence haploskupin mtDNA.....	12
2.5. Mutační rychlost jaderné DNA.....	12
2.5.1. Mutační rychlost Y chromozomu.....	13
3. Osídlování Austrálie.....	14
3.1. Evoluční cesta k <i>Homo sapiens</i> a migrace z Afriky.....	14
3.2. Geografické vyčlenění Austrálie.....	16
3.3. Archeologické nálezy v oblasti jezera Mungo v Austrálii.....	17
3.4. Osídlování Austrálie dle archeologického materiálu.....	18
3.5. Osídlování Austrálie dle vypočtené mutační rychlosti.....	20
3.5.1. Mitochondriální DNA.....	20
3.5.2. Y chromozom.....	22
3.5.3. Jaderná DNA.....	22
4. Závěr.....	24
5. Seznam použité literatury.....	25

## **Seznam použitých zkratek**

mtDNA – mitochondriální DNA

C - cytosin

G – guanin

DNMs – *de novo* mutace

$N_e$  - efektivní velikost populace

STR – krátké tandemové repetice (z angl. short tandem repeats)

aDNA – DNA archeologických vzorků (z angl. ancient DNA)

HVS1, HVS2 - hypervariabilní úsek 1, hypervariabilní úsek 2

PC1, PC2, PC3 - protein kódující geny: první, druhá a třetí pozice na kodonu

ML – metoda maximální pravděpodobnosti (z angl. maximum likelihood)

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)

LM1, LM3 – jezero Mungo1, 3 (z angl. Lake Mungo1, 3)

OSL - opticky stimulovaná luminiscence

## 1. Úvod

Jednou z možností jak datovat události v evoluci člověka a šíření lidských populací je odhad mutační rychlosti DNA. Na základě této mutační rychlosti je totiž možné určovat stáří posledního společného předka příbuzných druhů, nebo určit čas oddělení (divergence) jednotlivých haploskupin mitochondriální DNA (mtDNA) a Y chromozomu u člověka. Haploskupinou se rozumí skupina příbuzných haplotypů, tedy kombinace alel, které se dědí společně a pocházejí ze stejného uzlu fylogenetického stromu.

Odhadnout mutační rychlost je možné ze všech částí lidského či jiného genomu. Ve studiu evoluční genetiky se ale většinou používají nerekombinantní části genomu, tj. mitochondriální DNA a nerokombinantní část Y chromozomu. Jejich diverzita je dána pouze mutacemi, nikoliv rekombinací. Z toho je pak možné zjistit, jak populace v čase migrovaly, a také kdy odcházely z původní Afriky osídlit jednotlivé části světa.

Mezi regiony, které anatomicky moderní člověk osídlil jako první, patří i Sahul, tedy dnešní Austrálie a Nová Guinea. Na datování tohoto osídlení byly využity metody archeologické i molekulární. Pomocí jejich kombinace je možné přesněji vytvořit hypotézy, jak a kdy k osídlení Sahulu došlo.

Cíle práce:

Cílem této bakalářské práce je popsat a vysvětlit rozdíly v mutačních rychlostech jednotlivých partií lidského genomu a vyvodit z nich ve spojení s archeologickým materiálem závěry týkající se osídlování Sahulu.

Tato práce nejdříve seznámí čtenáře s problematikou odhadu mutační rychlosti a možnostmi její kalibrace. Bude se týkat dvou genomových partií: mitochondriální a jaderné DNA. V následující části bude nastíněna evoluce anatomicky moderních lidí, jejich migrace z Afriky do Eurasie a osídlování Sahulu (Austrálie a Nové Guineje) z hlediska archeologického i molekulárního.

## 2. Odhad mutační rychlosti

Dvě DNA sekvence mající společného předka si od času svého oddělení nahromadily mutace, kterými se dnes od sebe liší. Většina těchto mutací odpovídá jedno-nukleotidovým rozdílům, které můžeme spočítat, když máme tyto dvě sekvence vyrovnané proti sobě. Z většího souboru takovýchto sekvencí pak můžeme určit průměrný počet mutací vzniklých za jednotku času. Tím získáme průměrnou rychlost, kterou se mutace v genomu nahromadily. Tato rychlost pak může být zpětně využívána na odhad času, kdy došlo k oddělení dvou příbuzných druhů nebo populací (Scally a Durbin, 2012).

### 2.1. Obecné problémy s odhadem mutační rychlosti

Mutační rychlost se ovšem mezi genomovými partiemi liší, je závislá na typu nukleotidů i na typu mutace (Nachman a Crowell, 2000). U jedno-nukleotidových substitucí rozlišujeme transverzi (záměna purinové báze za pyrimidinovou a *vice versa*) a tranzici (záměna purinové báze za purinovou nebo záměna pyrimidinové báze za pyrimidinovou). Tranzice se vyskytují častěji než transverze, i navzdory tomu, že báze může projít dvěma transverzemi, ale jen jednou tranzicí. Rychlost vzniku transverze i tranzice je přibližně desetkrát vyšší u dinukleotidu CpG, kde je cytosin (C) následován na 3' konci guaninem (G), (Tabulka č. 1).

Většina CpG dinukleotidů v lidském genomu je metylována na 5' uhlíku cytosinu za vzniku 5 - metylcytosinu. Když cytosin projde spontánní nebo mutagenem indukovanou deaminací, vznikne uracil. Ten je rozeznán opravným systémem buňky, protože se v DNA za normálních okolností nevyskytuje, a dále je nahrazen cytosinem. Když ale dojde k deaminaci metylcytosinu, vznikne thymin, který je typický pro DNA, opravný systém jej nerozezná a mutace zůstane v dané sekvenci (Coulondre *et al.*, 1978). Tento mechanismus vysvětluje důvod zvýšené rychlosti vzniku tranzice na CpG dinukleotidech, mechanismus zvýšené rychlosti transverze zatím není znám. Podle Agnez-Lima *et al.* (2001) může být tento mechanismus spjat s oxidativním poškozením, jelikož se prokázalo, že guanosinové zbytky jsou více náchylné k transverzím nežli jiné báze během vystavení kyslíkovým radikálům *in vitro*.

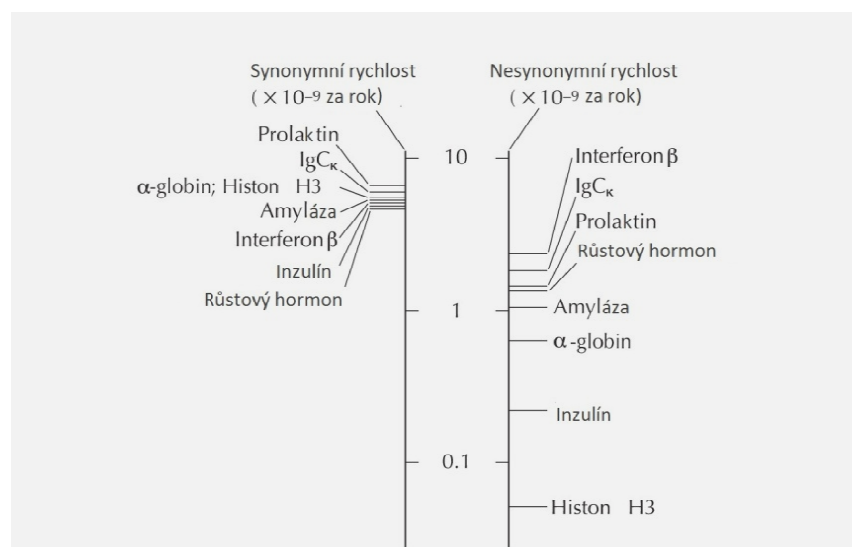
Tabulka č. 1: Odhady mutační rychlosti jedno-nukleotidových substitucí (upraveno podle Jobling *et al.*, 2013)

Typ mutace	Mutační rychlost (substituce/nukleotid/generace)		
	Nepřímý postup* (Ebersberger <i>et al.</i> , 2002)	Nepřímý postup* (Nachman a Crowell, 2000)	Přímý postup (Kong <i>et al.</i> , 2012)
<b>Všechny jednobázové substituce</b>	$2,2 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-8}$
<b>Tranzice</b>	$1,6 \times 10^{-8}$	-	$8,15 \times 10^{-9}$
<b>Tranzice bez CpG</b>	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$6,18 \times 10^{-9}$
<b>Tranzice na CpG</b>	$1,8 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,12 \times 10^{-7}$
<b>Transverze</b>	$5,8 \times 10^{-9}$	-	$3,87 \times 10^{-9}$
<b>Transverze bez CpG</b>	-	$5,5 \times 10^{-9}$	$3,76 \times 10^{-9}$
<b>Transverze na CpG</b>	-	$4,4 \times 10^{-8}$	$9,59 \times 10^{-9}$

\*Rychlosti určené nepřímým postupem jsou vypočtené pro čas divergence 5 miliónu let, efektivní velikost ancestrální populace  $10^4$  a generační dobu 20 let.

Mutační rychlost se liší i u vzniku synonymních (nevede k záměně aminokyseliny) a nesynonymních substitucí (vede k záměně aminokyseliny). Synonymní mutace vznikají rychleji než nesynonymní a jejich rychlost se shoduje u mnoha různých genů (Obrázek č. 1), (např. Nei a Gojobori, 1986; Soares *et al.*, 2009). Ve starších studiích byla právě z tohoto důvodu využívána rychlost synonymních mutací na datování divergence sekvencí blízké příbuzných druhů pomocí molekulárních hodin předpokládajících lineární nahromadění mutací v čase (Kafatos *et al.*, 1977).

Obrázek č. 1: Porovnání rychlosti synonymních substitucí a nesynonymních substitucí u různých genů (upraveno podle Barton *et al.*, 2007)



## 2.2. Metody odhadu mutační rychlosti

Existují dvě základní metody, jak mutační rychlost pro potřeby evoluční genetiky člověka určovat: přímá a nepřímá. Každá z těchto metod má určité nedostatky, které je podle potřeby možno kalibrovat.

### 2.2.1. Přímý postup pro odhad mutační rychlosti

Přímý postup je založený na počítání rozdílů mezi genomem rodiče a potomka, jinými slovy, určíme rychlost vzniku mutací za jednu generaci. Tato rychlost se nazývá *de novo* mutační rychlost, nebo i rychlost rodokmenová, protože se většinou jedná o analýzy u rodin, které jsou postižené nemocí (např. Roach *et al.*, 2010). Zjišťuje se, jak rychle vznikne mutace, která není přítomná u rodiče, ale u potomka už přítomná je (např. Awadalla *et al.*, 2010). Zmiňovaná mutace může být inserce, delece, ale z 90% se jedná o jednobázové substituce (Nachman a Crowell, 2000; Kondrashov, 2002).

Díky rozvoji molekulárně genetických technologií je dnes možné sekvenovat celý genom člověka, a tím přímo určit přítomnost *de novo* mutace (DNMs) mezi generacemi (např. Roach *et al.*, 2010; Sanders *et al.*, 2012). Když se jedná o příbuzné jedince, je možno vyhodnotit, zda detekovaná mutace vznikla chybou během sekvenování, nebo skutečnou mutační událostí v genomu potomka či sourozence.

### 2.2.2. Nepřímý postup pro odhad mutační rychlosti

Nepřímý postup, na rozdíl od postupu přímého, může určovat mutační rychlost podle toho, jaký je zvolený kalibrační bod. Může jím být čas oddělení dvou příbuzných, dnes žijících druhů nebo populací. Tento čas bývá odhadnutý např. z fosilního či archeologického materiálu. V případě odhadu mutační rychlosti mtDNA člověka se často využívá jako kalibrační bod čas divergence předků dnešního člověka a šimpanze (např. Soares *et al.*, 2009; Endicott a Ho, 2008). Sekvenční divergenci neboli počet nukleotidových substitucí naakumulovaných mezi těmito dvěma druhy, vydělíme dvojnásobkem stáří posledního společného předka a získáme mutační rychlost, která bývá nazývána i substituční či fylogenetická. Získanou rychlost můžeme využít na odhad času oddělení u recentnějších analýz, např. lidských haploskupin (např. Soares *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Slabiny přímého postupu odhadu mutační rychlosti

Nevýhodou přímého postupu je přítomnost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků, které je třeba nejdříve identifikovat a následně odstranit nebo minimalizovat. Awadalla *et al.* (2010) izolovali jadernou DNA rodičů a potomků z dvou zdrojů biologického materiálu: z krve a lymfoblastických buněčných linií (lymfocyty aktivované Epstein–Barr virem, aby se zvýšilo množství DNA na analýzu). Obdržené vzorky byly dále amplifikovány a sekvenovány a byl určen počet DNMs, které byly potvrzeny opakovaným sekvenováním, avšak DNA z buněčné linie jich obsahovala cca o 50% více. Následně bylo zjištěno, že tyto mutace vznikly během aktivace lymfoblastické buněčné linie Epstein–Barr virem, kdy došlo k zvětšení buněk, nárůstu objemu cytoplazmy a jádra, a množení těchto buněk jako reakce na přítomnost viru. To mělo za následek detekci falešně pozitivních DNMs. Bez porovnávací DNA izolované z krve by tedy nebyly falešně pozitivní DNMs objeveny a odhad mutační rychlosti by byl zkreslený, v tomto případě by byla rychlost dvojnásobně vyšší. Z toho plyne, že vhodná volba biologického materiálu je pro správný odhad mutační rychlosti klíčová.

Dalším faktorem ovlivňujícím odhad mutační rychlosti je generační doba. Generační dobou se rozumí průměrný reprodukční věk otce a matky u druhu, kterým se zabýváme (Langergraber *et al.*, 2012). Většina autorů rodokmenových analýz vyjadřuje mutační rychlost vztaženou na generaci, např.: substituce/nukleotid/generace (počet substitucí na nukleotid za generaci), substituce/locus/generace (počet substitucí na lokus za generaci). Když je ale potřeba tuto rychlost porovnat s rychlostí fylogenetickou, která bývá vztažena na rok, je nutno vydělit rychlost rodokmenovou průměrnou generační dobou. Generační doba u dnešního člověka se pohybuje okolo 30 let (Fenner, 2005), u šimpanze 25 let a u gorily kolem 19 let (Langergraber *et al.*, 2012). Předpokládá se, že během posledních několika milionů let došlo k prodloužení generační doby. Proto se po oddělení předka šimpanze používá u homininů délka generační doby kolem 15 - 25 let (např. Hobolth *et al.*, 2007; Nachman a Crowell, 2000; Santos *et al.*, 2005). Variabilita této hodnoty ovlivňuje po přepočtení z substituce/nukleotid/generace na substituce/nukleotid/rok výslednou hodnotu mutační rychlosti. Problém s rozlišnou generační dobou přirozeně platí i u přepočtu mutační rychlosti určené nepřímým postupem v jednotkách substituce/nukleotid/rok na substituce/nukleotid/generace, jedná se tedy o odchylku vzniklou přeměnou jednotek kterýmkoliv směrem.

Mezi DNMs přítomnými mezi genomem rodiče a genomem potomka se objevují i mírně škodlivé substituce, které zvyšují diverzitu (Soares *et al.*, 2009). Mírně škodlivé

substituce vlivem selekce po několika generacích vymizí, proto není možné je identifikovat u nepřímé fylogenetické analýzy, která počítá jenom se substitucemi, které se již fixovaly nebo substitucemi, které tvoří přirozený polymorfismus (např. Loogväli *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009).

#### 2.2.4. Slabiny nepřímého postupu odhadu mutační rychlosti

Mutační rychlost u nepřímé analýzy je obecně vztažena na dřívější oddělení (divergenci) dvou druhů nebo populací. Pro šíření a oddělování lidských populací může být kalibrována na čas divergence člověka a šimpanze. Jelikož ale zatím nebyl objeven žádný fosilní materiál nesporně prokazující stáří posledního společného předka člověka a šimpanze, není možné určit ani přesný čas koalescence (splynutí) DNA sekvencí těchto dvou druhů. Interval se u autorů používajících různé metody určení, ale i různé části genomu, pohybuje od 4 do 8 milionů let (Tabulka č. 2). Tato variabilita věku se výpočtem přímo přenesou do hodnoty fylogenetické mutační rychlosti, což je nutné zohlednit při porovnávání různě kalibrovaných rychlostí, nebo rychlost vypočítat pro více možností času divergence (např. Kondrashov, 2002).

Tabulka č. 2: Odhadované časy koalescence linií člověka a šimpanze od roku 1967 do roku 2007 (upraveno podle Bradley, 2008)

Zdroj	Rok publikace	Čas koalescence (v milionech let)
<b>Imunologická data</b>	1967	5
<b>DNA-DNA hybridizace</b>	1987	5,5
<b>DNA-DNA hybridizace</b>	1989	6 - 8
<b>mtDNA</b>	1995	4,7 - 5,2
<b>mtDNA</b>	2000	4 - 6
<b>mtDNA</b>	2003	5,4 - 9
<b>Jaderná DNA</b>	1998	6
<b>Jaderná DNA</b>	2001	4,6 - 6,2
<b>Jaderná DNA</b>	2003	5 - 7
<b>Jaderná DNA</b>	2004	5,3
<b>Jaderná DNA</b>	2005	5 - 7
<b>Jaderná DNA</b>	2007	3,7 - 4,5

Při datování speciace je potřeba zohlednit i fakt, že čas sekvenční divergence se nemusí shodovat s časem, kdy došlo k oddělení druhů, jinými slovy s dobou, kdy se staly reprodukčně izolovanými. Divergence některých sekvencí předchází reprodukční divergenci druhů či populací (Takahata, 1986). Rozdíl časů sekvenčního a reprodukčního oddělení je

přímo úměrný efektivní velikosti populace (Takahata *et al.*, 1995). Efektivní velikostí populace ( $N_e$ ) se rozumí velikost ideální panmiktické populace, ve které působí evoluční síly (zpravidla genetický drift a selekce) stejnou mírou jako v dané reálné populaci. Hodnoty  $N_e$  se rovněž liší podle prováděných studií a autorů a jsou zdrojem nepřesností při určování mutační rychlosti a času divergence populací (např. Nachman a Crowell, 2000).

Po divergenci dvou sekvencí majících společného předka počítáme rozdíly, které se nahromadily mezi nimi. Z těchto rozdílů ale nezjistíme, jestli se nahromadily po oddělení těchto sekvencí, nebo jestli se jedná o polymorfismus, který zdědily od posledního společného předka (ancestrální polymorfismus). Jestliže neodpočítáme příspěvek ancestrálního polymorfismu, tak rozdíly mezi sekvencemi budou početnější, a tím bude čas sekvenční divergence nadhodnocen (Charlesworth, 2010; Takahata a Satta, 1997).

Hodnota sekvenční divergence může být zase podhodnocena kvůli vícečetným substitucím v jednom páru bází, znamená to, že po určitém čase divergence přestane stoupat, protože dochází k opakovaným substitucím ve stejné pozici. Tento jev se nazývá sekvenční saturace (např. Ho *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2009). Je nutno ji brát v úvahu, hlavně když porovnáваме sekvence dvou druhů, které jsou od sebe fylogeneticky vzdálenější, jinými slovy když porovnáваме dvě starší větve fylogenetického stromu. Korekci vzhledem k saturaci je vhodné provést u mtDNA (např. Endicott a Ho, 2008; Ho *et al.*, 2005) a krátkých tandemových repetitiv (STR) Y chromosomu (Wei *et al.*, 2013; Zhivotovsky *et al.*, 2004), protože podléhají rychlejší evoluci, tudíž i rychlejší saturaci.

Podle Ebersberger *et al.* (2002) si porovnávání genomové DNA tak blízkých druhů jako člověk a šimpanz nevyžaduje korekci na saturaci sekvencí, jelikož by byla minimální a zásadně by výsledky nezměnila. Podobný výsledek získali i Soares *et al.* (2009) u mtDNA, přesněji se jednalo o konstrukci fylogenetického stromu obsahujícího 2196 celkových mitochondriálních genomů s kalibrací na čas divergence šimpanze a člověka před 7 miliony let. Pro testování rozsahu sekvenční saturace byly náhodně vybrány některé substituce a vytvořen model jejich výskytu v mitochondriálním genomu podle jejich relativní mutační rychlosti. Frekvence výskytu mutace ve fylogenetickém stromu tak odrážela specifickou mutační rychlost pro určitou pozici v DNA sekvenci. Z několika modelů došli Soares *et al.* (2009) k závěru, že pravděpodobnost, že v nejrychleji mutujícím místě mtDNA v jejich výzkumu vznikne mutace vícekrát, je 0,013 %, tedy velmi nízká a je nepravděpodobné, že by závažně ovlivnila výsledky sekvenční divergence, a následně výpočet celkové mutační rychlosti. Pro výpočet rychlostí jednotlivých úseků mtDNA ale saturace bývá zohledněna.

Při určování mutační rychlosti je samozřejmě důležitá i skutečnost, že rychlost vzniku mutací není stejná mezi jednotlivými druhy. V praxi to znamená, že když vypočítáme mutační rychlost u jednoho druhu, tak ji většinou nemůžeme použít u druhu jiného. Tyto mezidruhové rozdíly mohou být vysvětleny hmotností či velikostí těla, dlouhověkostí nebo věkem sexuální dospělosti (Nabholz *et al.*, 2008). Hypotéza generační doby ukazuje, že druhy s kratší generační dobou se častěji rozmnožují, a tedy mají větší počet buněčných dělení v germinální (zárodečné) linii, a tím i větší počet mutací vzniklých při replikaci DNA. Z toho vyplývá, že mají zvýšenou mutační rychlost, která je nepřímo úměrná generační době (Li *et al.*, 1987). Další vysvětlení nabízí metabolická hypotéza, která tvrdí, že mutagenní volné radikály, které jsou vedlejším produktem metabolismu, zodpovídají za mtDNA mutační rychlost (Martin, 1995). Na metabolismus má vliv velikost a teplota těla, a tím řídí mutační rychlost (Gilliooly *et al.*, 2005). Dlouhověké organismy si podle další hypotézy vyvinuly selektivní tlak na snížení oxidativního stresu během mitochondriálního dýchání, a díky tomu u nich dochází ke snížení počtu mutací za jednotku času (Nabholz *et al.*, 2008).

### **2.3. Kalibrace odhadu mutační rychlosti**

Mnohé studie se snaží vylepšit a upřesnit způsoby odhadu mutační rychlosti. Jednou z možností u lidských populací je kalibrovat mutační rychlost nejen v závislosti na čase divergence člověka a šimpanze, ale také využít novějších událostí v evoluci člověka, podle kterých je možné určit vnitrodruhovou rychlost. Endicott a Ho (2008) využili pro každou analyzovanou sekvenci kalibraci interní a externí, aby určili jejich spolehlivost. Koalescence člověka a šimpanze byla použita jako externí kalibrační bod a jako první bod interní kalibrace využili archeologicky podložený čas osídlování Austrálie a Nové Guiney a jako druhý bod znovuosídlování Evropy po posledním glaciálním maximu asociované s oddělením haploskupin H1 a H3 od jejich posledního společného předka. Využitím interní kalibrace dostali vyšší mutační rychlost lidské mtDNA než při kalibraci externí, a následné datování migrace anatomicky moderních lidí z Afriky a osídlování Evropy shledali lépe korelujícím s archeologickým materiálem. Využitím většího počtu exaktně datovaných kalibračních bodů je také možné odhalit změny mutační rychlosti v evoluci lidského genomu (Henn *et al.*, 2009).

Alternativní přístup pro dosažení větší přesnosti v měření mutační rychlosti je založen na analýze genetických dat z archeologických vzorků (tzv. aDNA z angl. ancient DNA), které byly datovány pomocí radiokarbonové metody. Radiokarbonové datování je založené na tom,



nekompletnost genomu, z těchto důvodů nebyly některé vzorky využity jako kalibrační body (Fu *et al.*, 2013).

## 2.4. Mutační rychlost mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA se na rozdíl od jaderné DNA vyskytuje v buňce ve velkém počtu kopií a to přispívá k tomu, že je také snadněji izolovatelná a snadněji využitelná na manipulaci. Jedná se o haploidní lokus děděný po mateřské linii, takže jeho efektivní velikost je čtyřikrát menší než u autozomálního lokusu.  $N_e$  je přímo úměrná rozdílu mezi časem sekvenční a reprodukční divergence, takže když je hodnota  $N_e$  nízká, tak i zmiňovaný rozdíl bude nízký (viz. kapitola 2.2.2.). To vede k možnému zanedbání rozdílu časů divergence sekvenční a reprodukční (např. Soares *et al.*, 2009; Endicott a Ho, 2008).

V porovnání s jadernou mutační rychlostí je mutační rychlost mtDNA až desetkrát vyšší, což způsobuje velký počet rozlišných mtDNA sekvencí mezi lidskými populacemi, a z tohoto důvodu je mtDNA často využívána pro evoluční studie (např. Fu *et al.*, 2013; Nabholz *et al.*, 2008). Umožňuje zjišťovat původ a migrace populací podle mateřské linie sestavením fylogenetického stromu odlišných mtDNA haploskupin, kde je subsaharská haploskupina L označována jako původní a z ní se větví další haploskupiny (např. Soares *et al.*, 2009).

Důvodem zvýšeného vzniku mutací v mtDNA je přítomnost vyššího množství mutagenů (volných kyslíkových radikálů) v mitochondriích, které jsou zodpovědné za energetický metabolismus buňky. K hypermutabilitě mtDNA může přispívat i to, že se replikuje častěji než jaderná DNA a při replikaci zůstává déle v jednořetězcové podobě. Kromě toho mtDNA není chráněna histony, což může vést k vyšší pravděpodobnosti vzniku mutace. Rychlost vzniku mutace se liší i mezi jednotlivými úseky mtDNA z důvodu nerovnoměrného působení selekce a sekvenční saturace v molekule (Tabulka č. 3).

Jelikož se mitochondriální a jaderná rychlost liší, liší se i postupy jak určovat a co zohledňovat při odhadu výsledného času divergence druhů a populací (např. výše uvedený příklad s  $N_e$ ). Někdy ale může dojít k neshodě a rozličnému datování posledního společného předka. Rozdíl mezi přímým a nepřímým odhadem mutační rychlosti je dán přítomností nefixovaných mírně škodlivých variant u rodokmenové analýzy, které časem odstraní purifikační selekce, a na úrovni fylogenetické jsou přítomny jen mutace již fixované. Toto je zřetelné hlavně u mtDNA, která rychle mutuje, ale mutace většinou po několika generacích vymizí. Rozdíl *de novo* a fylogenetické mutační rychlosti může být až desetinásobný. I z tohoto důvodu není *de novo* mtDNA využívána na evoluční studie.

Tabulka č. 3: Odhady mutační rychlosti úseků mtDNA

Způsob určení mutační rychlosti	Mutační rychlost (substituce/nukleotid/rok)				
	HVS1, HVS2 <sup>a</sup>	PC1, PC2 <sup>b</sup>	PC3 <sup>c</sup>	Celková molekula	Kódující úsek
<b>Nepřímý s externím kalibračním bodem</b> (Soares <i>et al.</i> , 2009, Soares <i>et al.</i> , 2012)	1,64 x 10 <sup>-7</sup> 2,30 x 10 <sup>-7</sup>	8,90 x 10 <sup>-9</sup>	1,93 x 10 <sup>-8</sup>	1,67 x 10 <sup>-8</sup>	-
<b>Přímý</b> (Santos <i>et al.</i> , 2005)	2,42 x 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
<b>Založený na aDNA</b> (Fu <i>et al.</i> , 2013)	-	8,20 x 10 <sup>-9</sup>	3,27 x 10 <sup>-8</sup>	2,16 x 10 <sup>-8</sup>	1,57 x 10 <sup>-8</sup>
<b>Nepřímý s interními kalibračními body</b> (Endicott a Ho, 2008)	-	1,30 x 10 <sup>-8</sup>	5,16 x 10 <sup>-8</sup>	-	-
<b>Nepřímý</b> (Mishmar <i>et al.</i> , 2003)	-	-	-	-	1,26 x 10 <sup>-8</sup>

<sup>a</sup> HVS 1, HVS 2 – hypervariabilní úsek 1, hypervariabilní úsek 2 kontrolního úseku mtDNA

<sup>b</sup> PC1, PC2 – protein kódující geny mtDNA: první a druhá pozice na kodonu

<sup>c</sup> PC3 – protein kódující geny mtDNA: třetí pozice na kodonu

Ve starších větvích fylogenetického stromu mtDNA je více synonymních substitucí než u mladších větví, kde převažují nesynonymní substituce. Tento rozdíl není možné rozeznat u rodokmenových analýz, jelikož u těch se jedná jen o analýzu několika generací (např. Kivisild *et al.*, 2006; Loogvali *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009). Jedním vysvětlením pro převládající nesynonymní substituce novějších větví může být nedostatek času pro purifikační selekci. Podle této hypotézy jsou nesynonymní mutace mírně škodlivého charakteru a postupně na ně působí purifikační selekce. Ve starších větvích působí déle, a proto je tam jejich počet nižší než počet synonymních substitucí (Kivisild *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2009).

Dalším vysvětlením může být ústup selekčního tlaku v nedávné době. Migrace z Afriky a konec posledního glaciálu umožnil expanzi lidských populací. Touto expanzí zřejmě došlo i k oslabení purifikační selekce. Starší větve fylogenetického stromu podléhaly silné selekci, a tedy převažují mutace, které neovlivňují funkci proteinů. Po následném nárůstu populace ale selekční tlak povolil a nesynonymní, mírně škodlivé mutace nebyly eliminovány v takové míře jako před expanzí. K oslabení selekce mohou přispívat kromě velikosti lidské populace i technologické a kulturní inovace moderních lidí (Loogvali *et al.*,

2009). V jak velké míře působí, by mohlo být detailněji objasněno porovnáváním s jinými druhy v příštích studiích.

### **2.4.1. Určení času divergence haploskupin mtDNA**

Kromě různých postupů pro odhad mutační rychlosti je možné zvolit i různé metody pro odhad divergence jednotlivých haploskupin. Abychom mohli určit stáří společného předka, je nutné přeměnit diverzitu sekvencí do času za využití různých statistických metod jako například rho statistika, nebo metoda ML (z angl. maximum likelihood). Rho statistika určuje průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi ancestrálním haplotypem a jednotlivými vzorky. V tomto případě je většinou fylogenetickou rekonstrukcí haplotypů mediánní síť, která dovoluje rekonstrukci ancestrálního uzlu i když není přítomen mezi zkoumanými vzorky. Stáří společného předka získáme podílem průměrného počtu nukleotidových rozdílů a mutační rychlosti daného segmentu. Metoda ML zase předpokládá hypotézu, která se upravuje pomocí změny parametrů v modelu nebo změnou samotného modelu tak, aby byl dosažen model s největší pravděpodobností. Mezi typické parametry evolučního modelu patří i mutační rychlost (Jobling *et al.*, 2013).

Metoda použitá pro odhad sekvenční divergence, stejně jako metoda zvolená pro odhad mutační rychlosti, ovlivňuje výsledné časy divergence haploskupin a populací v jednotlivých studiích. Řešením tohoto úskalí může být použití vícero metod pro možnou korekci odhadnutého času divergence. Například Soares *et al.* (2012) ve své studii využili na určení času divergence jednotlivých podskupin fylogenetického stromu L3 různé kombinace rho statistiky a ML s mutační rychlostí celého mitochondriálního genomu, nebo synonymní mutační rychlosti mtDNA.

## **2.5. Mutační rychlost jaderné DNA**

Odhad mutační rychlosti jaderné DNA není založen na jednom jediném lokusu jako je tomu u mtDNA, a tím jaderná DNA představuje širší spektrum pohledu na mutační rychlost a evoluci člověka. Rychlost vzniku mutací v jaderné DNA měřených z rodokmenů je asi o polovinu nižší než u fylogenetického odhadu (Tabulka č. 4), takže na rozdíl od mtDNA, kde převládá purifikační selekce, u jaderné DNA musí převládat jiný faktor.

Tabulka č. 4: Odhady mutační rychlosti jaderné DNA

Způsob určení mutační rychlosti	Průměrná mutační rychlost (substituce/nukleotid/rok)
<b>Nepřímý</b> <sup>a</sup> (Takahata a Satta, 1997)	1,00 x 10 <sup>-9</sup>
<b>Nepřímý</b> <sup>a</sup> (Nachman a Crowell, 2000)	1,00 x 10 <sup>-9</sup>
<b>Přímý z celého genomu</b> <sup>a</sup> (Roach <i>et al.</i> , 2010)	0,44 x 10 <sup>-9</sup>
<b>Přímý z celého genomu</b> <sup>a</sup> (Awadalla <i>et al.</i> , 2010)	0,54 x 10 <sup>-9</sup>
<b>Přímý z autosomů</b> <sup>a</sup> (Kong <i>et al.</i> , 2012)	0,48 x 10 <sup>-9</sup>

<sup>a</sup> přepočteno pro generační dobu 25 let

Jaderná DNA člověka obsahuje autozomy a pohlavní chromozomy X, Y. Podle studie McVean a Hurst (1997), má X chromozom nižší mutační rychlost v porovnání s autozomy. Jejich vysvětlení je založeno na tom, že selekce zmenšila mutační rychlost X chromozomu, protože recesivní škodlivé mutace vázané na X chromozom se projeví na fenotypu mužů v každé generaci. Nicméně Nachman a Crowell (2000) a ani Kondrashov (2002) nepotvrdili nižší mutační rychlost X chromozomu vzhledem k autozomům.

### 2.5.1. Mutační rychlost Y chromozomu

Y chromozom se skládá z pseudoautozomální části, která je schopna rekombinovat s X chromozomem a z části, která nerekombinuje, a ta je významná pro evoluční genetiku člověka. Tato nerekombinantní část tvoří většinu Y chromozomu a je specifická pro muže. Právě z ní se vytvářejí na základě jedno-nukleotidového polymorfismu (SNP) fylogenetické stromy určující původ a diverzitu mužské linie.

Rychlost vzniku mutace u Y chromozomu je zvýšená oproti zbytku genomu, protože na tvorbu samčích pohlavních buněk je potřeba více buněčných dělení než pro tvorbu samičích, a více buněčných dělení zvyšuje i pravděpodobnost chyby během replikace DNA. Kromě toho se samčí pohlavní buňky nachází v oxidativním prostředí s malým množstvím potřebných opravných mechanismů pro oxidativní poškození (Aitken a Graves, 2002).

U Y chromozomu se využívá dvojí systém odhadu mutační rychlosti. Za prvé se využívají jedno-nukleotidové mutace, neboli SNP a za druhé krátké tandemové repetice (STR), nazývané i mikrosatelity. STR jsou sekvence DNA složené z opakujících se jednotek o velikosti 1-7 nukleotidů (Zhivotovsky *et al.*, 2004) a mutují mnohem rychleji než SNP

(Tabulka č. 5), z tohoto důvodu je možné je využívat na určování časů šíření a divergence mladších populací, např. v oblasti vzdálené Oceánie, která byla osídlována až před 3 500 lety.

Tabulka č. 5: Odhady mutační rychlosti SNP a STR Y chromozomu

Způsob určení mutační rychlosti	Průměrná mutační rychlost (substituce/nukleotid/rok)	Průměrná mutační rychlost (mutace/mikrosatelit/rok)
<b>Nepřímý SNP</b> <sup>a</sup> (Kuroki <i>et al.</i> , 2006)	1,44 x 10 <sup>-9</sup>	-
<b>Přímý SNP</b> <sup>a</sup> (Xue <i>et al.</i> , 2009, Wei <i>et al.</i> , 2013 )	1,2 x 10 <sup>-9</sup>	-
<b>Nepřímý STR</b> <sup>a</sup> (Zhivotovsky <i>et al.</i> , 2004)	-	2,76 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Přímý STR</b> <sup>a</sup> (Heyer <i>et al.</i> , 1997)	-	8 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Kombinované STR</b> <sup>a</sup> (Pritchard <i>et al.</i> , 1999)	-	3,2 x 10 <sup>-5</sup>

<sup>a</sup> přepočteno pro generační dobu 25 let

Znatelný, až několikanásobný rozdíl je mezi odhadem mutační rychlosti přímým a nepřímým způsobem u STR. Z části může být tato neshoda vysvětlena tím, že na úrovni rodokmenů jsou zaznamenána i místa, která zmutují v jedné generaci, ale o několik generací později zmutují do předchozího stavu. Tyto mutace v rámci nepřímého odhadu populačních studií nejsou odhaleny (Zhivotovsky *et al.*, 2004).

### 3. Osídlování Austrálie

#### 3.1. Evoluční cesta k *Homo sapiens* a migrace z Afriky

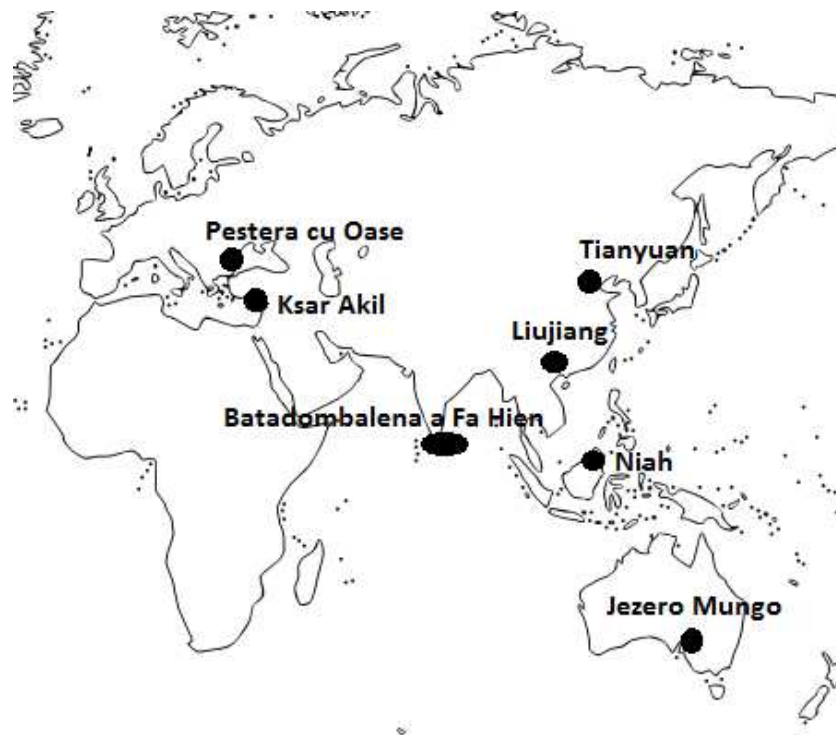
Před přibližně 2 miliony let se na území Afriky vyvinul rod *Homo* a některé z jeho populací v určitých časových intervalech migrovaly do Eurasie, kde se vyvinul *Homo erectus*. Později se na území Afriky vyvinul *Homo heidelbergensis*, jehož populace rovněž část Eurasie osídlily. I když dodnes není znám přesný fylogenetický vztah mezi archaickými populacemi Eurasie, je zřejmé, že určité skupiny se v novém prostředí adaptovaly, jako *Homo neanderthalensis* nebo *Homo floresiensis*. Další archaickou populací, která byla nalezena jen nedávno, jsou denisovaní, kteří se vyvíjeli paralelně s neandertálci v Asii (Lalueza-Fox a Gilbert, 2011). Výzkumy naznačují jejich možnou vazbu na *Homo heidelbergensis* (Meyer *et al.*, 2014).

Podle modelu recentního afrického původu se z populací, které zůstaly v Africe, vyvíjeli v rozmezí před 100 000 – 200 000 lety anatomicky moderní lidé (*Homo sapiens*), a ti

pak migrovali z Afriky do dalších částí světa, kde nahradili archaické druhy. Tato populační „náhrada“ však nebyla stoprocentní. Na území Eurasie totiž došlo ke krátkodobému genovému toku mezi *Homo sapiens* a archaickými populacemi z okruhu *Homo heidelbergensis* (Stringer, 2012). Většina lidských genomů proto obsahuje slabší příměs DNA archaických populací, např.: Evropané, Asiati, Američané obsahují příměs neandertálské DNA (Green *et al.*, 2010), zatímco Australané a Melanéšané nesou kromě neandertálské DNA i DNA denisovanů (Green *et al.*, 2010, Reich *et al.*, 2010). Stopy míšení homininů jsou patrné v jaderné DNA, nikoli na úrovni uniparentálně děděných lokusů, tedy mtDNA a Y chromozomu.

Stále aktuální otázkou zůstává, kdy přesně došlo k expanzi anatomicky moderních lidí z Afriky a k osídlování dalších regionů. Pomineme-li přechodnou přítomnost anatomicky moderních lidí mimo Afriku během posledního interglaciálu před více než 100 tisíci lety, pak jedno z nejstarších nalezišť potvrzující přítomnost *Homo sapiens* mimo Afriku (Obrázek č. 3) je Ksar Akil v Libanonu blízko Bejrútu, kde byly nalezeny mimo jiné i kosterní pozůstatky dvou jedinců *Homo sapiens*. Radiokarbonovou metodou byl určen věk starších ostatků v rozmezí 42 400 – 41 700 let (Douka *et al.*, 2013).

Obrázek č. 3: Některé z nejstarších archeologických nalezišť *Homo sapiens* mimo Afriku (volně upraveno podle Endicott *et al.*, 2009)



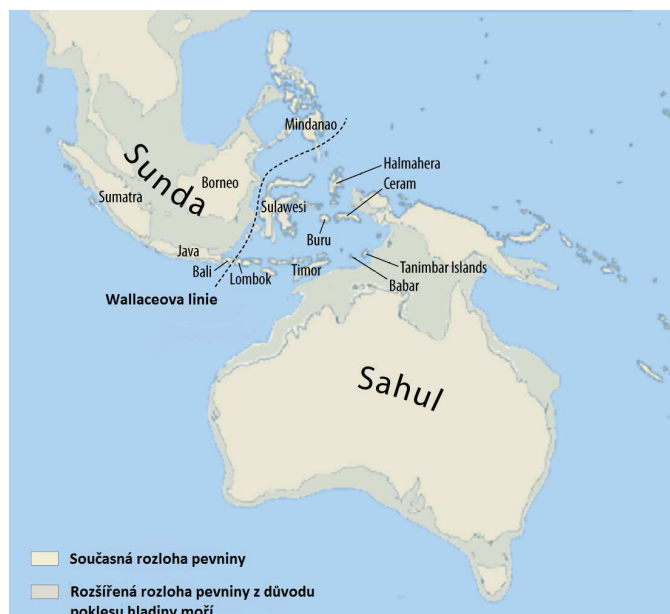
V Pesteru cu Oase v Rumunsku byla nalezena čelist moderního člověka, datovaná stejnou metodou do období před 34 000 – 36 000 lety (Trinkaus *et al.*, 2013), na Srí Lance

pak v dvou jeskyních (Batadombalena a Fa Hien) byly ostatky *Homo sapiens* staré 28 000 – 34 000 let (Kennedy a Deraniyagala, 1989). Kosterní důkazy anatomicky moderního člověka v jeskyni Tianyuan v Číně byly datovány v rozmezí před 39 000 – 42 000 lety (Shang *et al.*, 2007) a v jeskyni Niah na Borneu v rozmezí před 34 000 - 46 000 lety (Barker *et al.*, 2007). Archeologické nálezy, které jsou datovány do dřívějších období, jsou kontroverzní, např. na území Liujiang, kde stáří *Homo sapiens* bylo odhadnuto dle stratigrafických vrstev na více než 65 000 let. Vyskytly se ale pochybnosti kvůli možné erozi (Shen *et al.*, 2002). Z výše zmiňovaných archeologických nálezů plyne, že anatomicky moderní člověk se šířil na území Eurasie před cca 45 000 lety.

### 3.2. Geografické vyčlenění Austrálie

Asi před 100 tisíci lety, když byla hladina oceánu nižší, tvořila Austrálie společně s Novou Guineou, Tasmánií a několika menšími ostrovy společný kontinent, který je nazýván Sahul. Sumatra, Jáva, Borneo a Indočína tvořily kontinent Sunda. I když hladina moří byla nízká, Sundu a Sahul oddělovalo asi 90 km moře, protože k jejich oddělení došlo už před 70 miliony let. Kromě vodní bariéry byly odděleny i biologickou bariérou, která existuje dodnes. Fauna a flora, které se vyskytují na jedné straně, neproniknou na stranu druhou, jsou odděleny tzv. Wallaceovou linií (Obrázek č. 4).

Obrázek č. 4: kontinenty Sahul a Sunda oddělené Wallaceovou linií (Map of Sunda and Sahul.png [online])



Přechodu do vzdálené Austrálie nebyl zřejmě schopný ani *Homo erectus*, který byl podle archeologických nálezů v jihovýchodní Asii přítomen již před 1,8 miliony let (Jobling *et al.*, 2013).

### 3.3. Archeologické nálezy v oblasti jezera Mungo v Austrálii

Nejstarší kosterní nálezy fosílií anatomicky moderního člověka v Austrálii byly objeveny v roce 1974. Jedná se o téměř kompletní kostru označenou jako LM3 (z angl. Lake Mungo 3) nalezenou v dnes už vyschlém jezeře Mungo na východě Nového Jižního Walesu (Obrázek č. 3, Obrázek č. 5).

Obrázek č. 5: kostra LM3 z oblasti jezera Mungo v jihovýchodní Austrálii (Jobling *et al.*, 2013)



Na datování LM3 bylo použito mnoho způsobů a dosažené výsledky se častokrát lišily. Původně bylo určeno stáří kostí na 30 000 let (Bowler a Thorne, 1976 podle Bowler 1998). Bowler (1998) později datoval stratigrafické vrstvy místa nálezu a určil čas pohřbení v rozmezí před 42 000 až 45 000 lety. Thorne *et al.* (1999) použili na datování pohřbeného skeletu vícero metod, například opticky stimulovanou luminiscenci (OSL) nebo metodu urániových sérií v kombinaci s elektronovou spinovou rezonancí. Stáří LM3 bylo těmito metodami datováno v rozmezí 60 000 - 62 000 let.

Bowler a Magee (2000) a Gillespie a Roberts (2000) výsledky Thorne *et al.* (1999) zpochybnili a vrátili se k předpokladu, že datování pohřbu kostry je mladší. Jejich pochybnosti byly založeny zejména na tom, že od času nálezu kostry v roce 1974 až do doby, kdy byly prováděny analýzy kolektivem Thorne *et al.* (1999) došlo k erozi půdy, která

v tomto výzkumu nebyla vzata v úvahu, a tedy výsledné datování stratigrafických vrstev v okolí kostry je mylné.

Bowler *et al.* (2003) zopakovali výzkum stratigrafických vrstev v jezeře po stratigrafické korelaci, tj. upravení modelu stratigrafických vrstev vzhledem na proběhlou erozi. Byly odebrány vzorky sedimentu a metodou OSL byl určen jejich věk ve dvou různých laboratořích s přihlédnutím na kontaminace určené paralelní analýzou duplikátu vzorků. Optický věk horizontálního řezu stratigrafických vrstev pod a nad LM3 se pohybuje v intervalu 62 000 po 30 000 let. Přesněji byl LM3 umístěn do hrobu hlubokého 80 – 100 cm ve vrstvě datované zpřed  $42\,000 \pm 3\,000$  let. Vrstva, která shora utěšňovala hrob, byla  $38\,000 \pm 2\,000$  let stará. Z toho vyplývá, že LM3 byl pohřben před  $40\,000 \pm 2\,000$  lety, v souladu se starší studií Bowler (1998).

Ještě před nálezem LM3, byly v roce 1969 objeveny v jezeře Mungo zpopelněné pozůstatky *Homo sapiens* LM1 (z angl. Lake Mungo 1) datované radiokarbonovou metodou na stáří v intervalu 24 500 – 26 500 let (Bowler *et al.*, 1970) nebo 18 000 – 20 000 let (Gillespie, 1997), tedy mnohem mladší než LM3. Bowler *et al.* (2003) ale určili metodou OSL sedimentu věk LM1 shodný s věkem LM3 a rozdíl s datováním radiokarbonovou metodou přisoudili kontaminaci předchozích vzorků mladším uhlíkem. V oblasti jezera Mungo byly nalezeny i pravěké nástroje datované v rozmezí před  $50\,100 \pm 2\,400$  až  $45\,700 \pm 2\,300$  lety. Z toho plyne, že se jedná o zatím nejstarší důkaz lidské přítomnosti v této oblasti (Bowler *et al.*, 2003). Kromě toho zde bylo objeveno ještě dalších 775 artefaktů, jejichž rozmístění v rámci stratigrafických vrstev naznačuje přerušované osídlení tohoto prostoru. Maximální hustota osídlení je datována do období před 43 000 až 45 000 lety, následný pokles této hustoty je odrazem vysychání jezera, k němuž došlo před 40 000 lety. V rozmezí před 50 000 až 40 000 lety nastávají změny v složení půdy jezera a jeho okolí, což dokazuje krátkodobé změny výšky hladiny vody. Tyto změny se časově shodují s příchodem lidských populací do této oblasti (Bowler *et al.*, 2003).

### **3.4. Osídlování Austrálie dle archeologického materiálu**

Když vezmeme v úvahu argumenty proti datování LM3 v rozmezí před 60 000 - 62 000 lety (Bowler a Magee, 2000, Gillespie a Roberts, 2000), tak příchod anatomicky moderního člověka do jihovýchodní části Austrálie probíhal v intervalu před 50 000 až 46 000 lety. Právě v tomto období, došlo i k celoplošnému vymizení megafauny v Austrálii. Megafaunou se rozumí savci, plazy a ptáci vážící více než 100 kg, například trojmetroví

klokani, nebo jednotunoví masožraví ještěři. Příčina masivního vyhynutí megafauny je stále předmětem diskuzí, je možné, že je za to zodpovědný člověk přímo jako lovec, nebo nepřímo zásahem do životního prostředí (Roberts *et al.*, 2001). Podobné vyhynutí živočišných druhů proběhlo několik tisíciletí po vyhynutí megafauny v Austrálii, na území Severní a Jižní Ameriky, na Madagaskaru a na Novém Zélandu. Každé z těchto událostí předcházelo příchod člověka (Martin a Steadman, 1999 podle Roberts *et al.*, 2001).

Mezi nejstarší archeologická naleziště na území Austrálie patří Devil's Lair v jihozápadním cípu Austrálie. Jedná se o vápencovou jeskyni, ve které byly při výkopech nalezeny kamenné artefakty odpovídající schopnostem anatomicky moderního člověka, ohniště a kosti. Přítomnost člověka na tomto místě byla datována cca před 48 000 lety (Turney *et al.*, 2001). V severní Austrálii se blízko sebe nacházejí další dvě z nejstarších archeologických nalezišť předpokládajících přítomnost *Homo sapiens*, Malakunanja II a Nauwalabila I. Stáří archeologických artefaktů v těchto lokalitách bylo určeno metodou OSL v rozsahu 53 000 až 60 000 let (Roberts *et al.*, 1990, Roberts *et al.*, 1994). O'Connell a Allen (2004) ale nastínili možnost, že došlo k vertikálnímu posunu artefaktů nalezených v těchto lokalitách do starších vrstev, a tyto artefakty jsou tedy mladší, než předpokládal Roberts *et al.* (1990) a Roberts *et al.* (1994). Groube *et al.* (1986) na základě archeologických důkazů uvedli ve své studii, že i Papua Nová Guinea byla před 40 000 lety již osídlena anatomicky moderním člověkem.

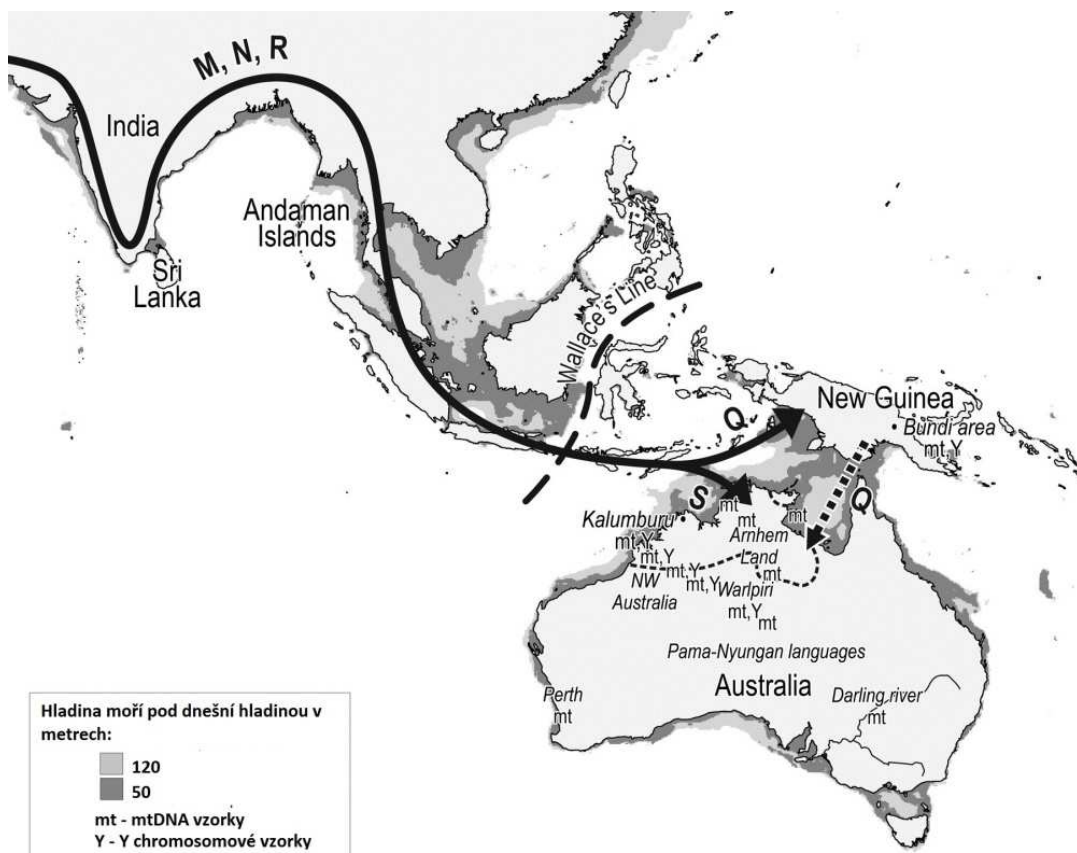
První osídlení Sahulu zřejmě probíhalo z Afriky přes jih Asie až do Nové Guiney a severní části Austrálie. Z archeologického materiálu na území Austrálie plyne, že anatomicky moderní člověk byl zde přítomen již v období před 50 000 lety (eventuelně před 60 000 lety). Nejstarší fosilní důkazy šíření *Homo sapiens* na území Eurasie jsou ale až z období před 45 000 lety, a na jihu Eurasie, kudy vedla předpokládaná cesta migrace jsou nálezy ještě mladší (viz. kapitola 3.1.). Je možné, že první osídlení Sahulu proběhlo před 50 000 – 60 000 lety a dalo vznik australským a papuánským populacím. Na území Asie se ale nezachoval z tohoto období archeologický materiál, který by tuto migraci dokazoval. Fosilní materiál v jižní a jihovýchodní Asii (například z jeskyně Batadombalena a Fa Hien) je až z pozdějšího období, kdy mohlo dojít k druhé migraci jižní cestou až do Austrálie (Lahr a Foley, 1994).

### 3.5. Osídlování Austrálie dle vypočtené mutační rychlosti

#### 3.5.1. Mitochondriální DNA

Haploskupiny bývalého Sahulu, přesněji Austrálie a Nové Guiney, jsou potomky základních ne-afrických haploskupin M, N a R (Obrázek č. 6). Jinými slovy, Australci a Papuánci jsou potomci těch samých ne-afrických haploskupin jako Eurasiaté (Hudjashov *et al.*, 2007). Stáří jejich posledního společného předka, haploskupiny L3, která vznikla ještě v Africe, bylo odhadnuto dle různých mutačních rychlostí v širokém intervalu od 55 000 do 80 000 let. Stejně tak i stáří haploskupin M, N a R, a tedy migrace anatomicky moderního člověka z Afriky byla datována v širokém intervalu 50 000 – 77 000 let. Ve vrchní hranici intervalu se pohybuje kalibrace mutační rychlosti podle Fu *et al.* (2013), ve spodní hranici pak analýza dle Endicott a Ho (2008). Nejpravděpodobnější doba migrace anatomicky moderního člověka z Afriky se pohybuje v rozsahu 61 000 – 65 000 (Fernandes *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012).

Obrázek č. 6: Šíření mitochondriálních haploskupin podél jižního pobřeží Asie do Austrálie (upraveno podle Hudjashov *et al.*, 2007)



Analýza zakladatelských haploskupin mtDNA východních, jižních a západních Eurasiatů a Australců ukázala, že časové rozmezí osídlování těchto území je velice krátké, území od Indie po Asii bylo osídleno přibližně za 3 000 – 5 000 let (Macaulay *et al.*, 2005; Hudjashov *et al.*, 2007). Příchod anatomicky moderního člověka do Austrálie tedy podle tohoto odhadu mohl nastat nejdříve před 60 000 lety, což odpovídá nejstarším archeologickým nálezům na území Austrálie (viz. kapitola 3.4.), nálezy podél jižního pobřeží Eurasie, jako možné cesty migrace, jsou ale mladší.

Hypotéza migrace anatomicky moderního člověka z Afriky podél jižního pobřeží Asie až do Austrálie byla ve studii Sun *et al.* (2006) podpořena distribucí haploskupin M v Eurasii a Oceánii. Soares *et al.* (2009) ale stáří haploskupiny M na území Indie datovali kolem  $49\,400 \pm 10\,500$  let a ve východní Asii kolem  $60\,600 \pm 13\,500$  let. Haploskupina M ve východní Asii je tedy starší, což neodpovídá modelu migrace ze západu na východ Asie. Je ale možné, že haploskupina M vznikla až ve východní Asii a později migrovala zpět do jižní Asie. Podle tohoto modelu by pak původně migrovala podél jižního pobřeží prekursorová haploskupina M (pre-M).

Specifická haploskupina na území Austrálie, která nebyla detekovaná na jiném kontinentě, je haploskupina S (Rohl *et al.*, 2001). Vznikla z haploskupiny N tranzicí v nukleotidové pozici 8404. Hluboké zakotvení této haploskupiny na jednom kontinentě naznačuje genetickou izolaci Austrálie od času jejího prvního osídlení, dokonce izolaci i od Nové Guiney, s kterou byla spojená pevninským mostem až do doby cca před 8 000 lety (Hudjashov *et al.*, 2007).

Původně byla haploskupina Q považovaná za vyskytující se jenom na území Melanésie a Nové Guiney, ale Hundjashov *et al.* (2007) našli mutace typické pro Q i u Australců. Jelikož se nejednalo o žádné typické podskupiny Q rozšířené v Nové Guineji, usoudili, že se nejedná ani o mylný vzorek ani o recentní příchod z Nové Guiney. Odhad času divergence od Q Nové Guiney určili před  $30\,400 \pm 9\,300$  lety, a z toho vyvodili sekundární příchod anatomicky moderního člověka z Nové Guiney před tím, než byla Nová Guinea a Austrálie odděleny mořem. Kromě tohoto ale nebyl zaznamenán jiný genový tok do Austrálie, takže se předpokládá, že Austrálie byla od jejího prvního osídlení izolovaná, což nemusí být nutně v rozporu s možnou výše uvedenou interpretací archeologického materiálu (viz. kapitola 3.4.), neboť migrace anatomicky moderního člověka podél jižního pobřeží Asie probíhat mohla, ale nepronikla do Austrálie.

### 3.5.2. Y chromozom

Čas migrace anatomicky moderního člověka z Afriky byl podle SNP mutační rychlosti Y chromozomu určen v rozmezí před 57 000 – 74 000 lety (Wei *et al.*, 2013). Tento časový interval se překrývá s intervalem určeným dle STR analýzy (Pritchard *et al.*, 1999) a odpovídá i výše zmiňovanému času migrace dle mtDNA haploskupin. Paternální haploskupiny Austrálie a Nové Guiney jsou přímými potomky zakladatelských ne-afrických haploskupin C a F, což opět v shodě s mtDNA dokazuje, že Australci a Papuánci jsou potomky stejné emigrantské skupiny z Afriky jako Eurasiaté (Hudjashov *et al.*, 2007).

Rozdělení podskupin C haploskupiny je místně specifické, například C1 a C3 se vyskytují v západní Asii, C5 v Indii, C2 je typická pro Novou Guineu, a Austrálie má pro sebe charakteristickou C4 haploskupinu. Tato diferenciace C haploskupin podporuje hypotézu dlouhého období izolace Austrálie, jelikož je zřejmé, že tyto haploskupiny vznikaly nezávisle na sobě (Hudjashov *et al.*, 2007), a tedy nepředpokládá druhou vlnu osídlování Austrálie a Nové Guiney.

### 3.5.3. Jaderná DNA

Použitím mutační rychlosti odhadnuté nepřímým postupem je čas divergence africké a ne-africké populace určen na čas před cca 50 000 lety, stejně jako čas migrace anatomicky moderního člověka z Afriky do Eurasie. Tento čas úplně neodpovídá archeologickým nálezům na území Eurasie, jelikož ty jsou datovány až před cca 45 000 lety, a nevysvětluje ani starší nálezy v Austrálii. Dle mutační rychlosti určené přímým postupem by k oddělení ne-africké od africké populace mělo dojít v časovém intervalu před 90 000 – 130 000 lety. Kvůli neshodě tohoto času s mtDNA, Y chromozomem a archeologickým materiálem se předpokládá, že k oddělení dvou populací mohlo dojít již na území Afriky. A jedna populace mohla expandovat na Blízký východ (na Arabský poloostrov), kde několik tisíciletí setrvala (jsou zde archeologická naleziště stará více než 100 000 let, původně se předpokládala přechodná doba setrvání anatomicky moderního člověka nezávislá od pozdější migrace z Afriky) a až potom došlo k migraci do Eurasie a Austrálie (Scally a Durbin, 2012).

Rasmussen *et al.* (2011) určili podle aDNA Australce porovnávané s DNA různých eurasijských a amerických populací, že Australci jsou potomky migrace anatomického člověka z Afriky, která proběhla v rozmezí před 62 000 až 75 000 lety. V tomto období došlo i k minoritnímu genovému toku mezi anatomicky moderním člověkem a denisovany zde žijícími. Tato větev dala vznik Australcům a Papuáncům, nikoliv dnešním Asiatům. Dle

genetické analýzy jsou Asiáté potomky druhé vlny migrace z Afriky podél jižního pobřeží Asie na východ v rozmezí před 25 000 až 38 000 lety, což odpovídá datování fosilních nálezů z jeskyně Batadombalena a Fa Hien na jihu Asie (viz. kapitola 3.1.). Tehdy došlo v Asii k nahrazení populací a k nerovnoměrné příměsi DNA z první vlny migrace do druhé. Populace Austrálců a horských Papuánců ale nebyly genovým tokem z druhé vlny zasaženy, což se shoduje s výsledky analýzy mtDNA (viz. kapitola 3.5.1.) a Y chromozomu (viz. kapitola 3.5.2.).

## 4. Závěr

Odhad mutační rychlosti se provádí dvěma základními způsoby: přímým a nepřímým. Oba tyto postupy mají určité slabiny, které je potřeba minimalizovat anebo alespoň vzít do úvahy jako možný zdroj nesouladu mezi jednotlivými studii. Metody pro odhad mutační rychlosti je podle potřeby možno různě obměňovat či kalibrovat pro dosažení adekvátnějšího výsledku.

Mutační rychlosti se mezi jednotlivými genomovými partiemi liší v závislosti na obsahu sekvencí, typu mutace, ale také v závislosti na počtu replikací, které podstoupí DNA a na prostředí, ve kterém se nacházejí. Například mtDNA se nachází v oxidačním prostředí, které způsobuje její zvýšenou mutační rychlost oproti autozomálním lokusům.

Odhad času divergence populací podle mutační rychlosti ve spojení s archeologickými metodami pomáhá odhalit evoluční historii člověka a jeho šíření do celého světa. Právě spojením těchto dvou metod byl v této práci nastíněn možný scénář osídlování Sahulu nejpravděpodobněji v rozmezí před 50 000 až 60 000 lety jako první vlna migrace anatomicky moderního člověka z Afriky podél jižního pobřeží Asie až do Austrálie a Nové Guiney. Chybějící archeologický materiál podél pobřežní cesty migrace z tohoto období, který mohl být zničen například vzestupem hladiny moře od doby osídlování, byl doplněn molekulárním důkazem příměsí DNA první migrace k DNA druhé migrace, která dala vznik Asiatům. Fosilní nálezy na území Srí Lanky datované před 28 000 – 34 000 lety časově zapadají do období pozdější migrace. Ke genovému toku mezi Australci, Papuánci a touto sekundární migrací zřejmě již nedošlo a Australci a Papuánci se dlouhodobě vyvíjeli v izolaci.

Genetické ani archeologické metody nejsou bezchybné, proto i časový interval osídlení Sahulu je velmi široký a v jednotlivých studiích se liší o tisíce let. Vylepšení kalibrace dosavadních metod by mohlo v budoucnu vést k zpřesnění datování jednotlivých etap lidské evoluce a šíření lidských populací.

## 5. Seznam použité literatury

Aitken, R.J. & Graves, J.A.M., 2002. The future of sex. *Nature*: 415(6875):963.

Agnez-Lima, L.F., Di Mascio, P., Demple, B. & Menck, C.F., 2001. Singlet molecular oxygen triggers the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Biological Chemistry* 382(7):1071-5.

Awadalla, P., Gauthier, J., Myers, R.A., Casals, F., Hamdan, F.F., Griffing, A.R., Côté, M., Henrion, E., Spiegelman, D., Tarabeux, J., Piton, A., Yang, Y., Boyko, A., Bustamante, C., Xiong, L., Rapoport, J.L., Addington, A.M., DeLisi, J.L., Krebs, M.O., Joob, R., Millet, B., Fombonne, E., Mottron, L., Zilvermit, M., Keebler, J., Daoud, H., Marineau, C., Roy-Gagnon, M.H., Dubé, M.P., Eyre-Walker, A., Drapeau, P., Stone, E.A., Lafrenière, R.G. & Rouleau, G.A., 2010. Direct measure of the *de novo* mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *American journal of human genetics*, 87(3): 316–324.

Barker, G., Barton, H., Bird, M., Daly, P., Datan, I., Dykes, A., Farr, L., Gilbertson, D., Harrison, B., Hunt, C., Higham, T., Kealhofer, L., Krigbaum, J., Lewis, H., McLaren, S., Paz, V., Pike, A., Piper, P., Pyatt, B., Rabett, R., Reynolds, T., Rose, J., Rushworth, G., Stephens, M., Stringer, C., Thompson, J. & Turney C, 2007. The 'human revolution' in lowland tropical Southeast Asia: the antiquity and behavior of anatomically modern humans at Niah Cave (Sarawak, Borneo). *Journal of human evolution*: 52(3):243-61.

Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J. A., Goldstein, D.B. Patel, N.H., 2007. Evolution first edition. Cold Springs Harbor Laboratory Press.

Bowler, J.M., Jones, R., Allen, H. & Thorne, A. G. , 1970. Pleistocene human remains from Australia: a living site and human cremation from Lake Mungo, western New South Wales. *World Archaeology* 2: 39–60.

Bowler, J. M., 1998. Willandra Lakes revisited: environmental framework for human occupation. *Archaeol. Oceania* 33: 120–155.

Bowler, J.M. & Magee, J.W., 2000. Redating Australia's oldest human remains: a sceptic's view. *Journal of human evolution* 38, 719–726.

Bowler, J.M., Johnston, H., Olley, J.M., Prescott, J.R., Roberts, R.G., Shawcross, W. & Spooner, N.A., 2003. New ages for human occupation and climatic change at Lake Mungo, Australia. *Nature* 421: 837-840.

Bradley, J. B., 2008. Reconstructing phylogenies and phenotypes: a molecular view of human evolution. *Journal of anatomy* 212(4): 337–353.

Charlesworth, D., 2010. Apparent recent elevation of mutation rates Don't forget the ancestral polymorphisms. *Heredity* 105: 509–510.

Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J. & Gilbert, W., 1978. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274(5673):775-780.

- Douka, K., Bergman, C.A., Hedges, R.E.M., Wesselingh, F.P. & Higham, T.F.G., 2013. Chronology of Ksar Akil (Lebanon) and Implications for the Colonization of Europe by Anatomically Modern Humans. *PLoS ONE* 8(9): e72931.
- Ebersberger, I., Metzler, D., Schwarz, C. & Pääbo, S., 2002. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. *American Journal of Human Genetics* 70(6):1490-1497.
- Endicott, P. & Ho, S. Y., 2008. A Bayesian evaluation of human mitochondrial substitution rates. *American Journal of Human Genetics* 82(4): 895–902.
- Endicott, P., Ho, S.Y., Metspalu, M. & Stringer, C., 2009. Evaluating the mitochondrial timescale of human evolution. *Trends in ecology & evolution* 24(9):515-21.
- Fenner, J. N., 2005. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *American Journal of Physical Anthropology* 128 (2): 415–423.
- Fernandes, V., Alshamali, F., Alves, M., Costa, M.D., Pereira, J.B., Silva, N.M., Cherni, L., Harich, N., Cerny, V., Soares, P., Richards, M.B. & Pereira, L., 2012. The Arabian cradle: mitochondrial relicts of the first steps along the southern route out of Africa. *American Journal of Human Genetics* 90(2):347-55.
- Fu, Q., Mittnik, A., Johnson, P.L., Bos., K., Lari, M., Bollongino, R., Sun, C., Giemsch, L., Schmitz, R., Burger, J., Ronchitelli, A.M., Martini, F., Cremonesi, R.G., Svoboda, J., Bauer, P., Caramelli, D., Castellano, S., Reich, D., Pääbo, S. & Krause J., 2013. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Current biology* 23(7):553-9.
- Gillespie, R., 1997. Burnt and unburnt carbon: dating charcoal and burnt bone from the Willandra Lakes, Australia. *Radiocarbon* 39: 225–236.
- Gillespie, R. & Roberts, R.G., 2000. On the reliability of age estimates for human remains at Lake Mungo. *Journal of Human Evolution* 38: 727–732.
- Gillooly, J.F., Allen, A.P., West, G.B. & Brown, J.H., 2005. The rate of DNA evolution: effects of body size and temperature on the molecular clock. *PNAS* 102:140-145.
- Gojobori, T. & Nei, M., 1986. Relative contributions of germline gene variation and somatic mutation to immunoglobulin diversity in the mouse. *Molecular Biology and Evolution* 3(2):156-67.
- Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H., Hansen, N.F., Durand, E.Y., Malaspina, A.S., Jensen, J.D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H.A., Good, J.M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R.W., Johnson, P.L., Eichler, E.E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J.C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso,

- J., Lachmann, M., Reich, D. & Pääbo, S., 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328(5979):710-22.
- Groube, L., Chappell, J., Muke, J. & Price D., 1986. A 40,000 year-old human occupation site at Huon Peninsula, Papua New Guinea. *Nature*: 324(6096):453-5.
- Heyer, E., Puymirat, J., Dietjes, P., Bakker, E. & de Knijff, P., 1997. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Human Molecular Genetics* 6:799–803.
- Henn, B.M., Gignoux, C.R., Feldman, M.W. & Mountain, J.L., 2009. Characterizing the time dependency of human mitochondrial DNA mutation rate estimates. *Molecular Biology and Evolution* 26: 217–230.
- Ho, S. Y. W., Phillips M. J., Cooper, A. & Drummond A. J., 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 22:1561-1568.
- Hobolth, A., Christensen, O.F., Mailund, T. & Schierup, M.H., 2007. Genomic Relationships and Speciation Times of Human, Chimpanzee, and Gorilla Inferred from a Coalescent Hidden Markov Model. *PLoS Genetics*, 3(2): e7.
- Hudjashov, G., Kivisild, T., Underhill, P.A., Endicott, P., Sanchez, J.J., Lin, A.A., Shen, P., Oefner, P., Renfrew, C., Villems, R. & Forster P., 2007. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. *PNAS* 104 (21): 8726-8730.
- Jobling, M., Hollox, E., Hurles, M., Kivisild, T. & Tyler-Smith, C., 2013. Human Evolutionary Genetics second edition. New-York and London: Garland Science.
- Kafatos, F.C., Efstratiadis, A., Forget, B.G. & Weissman, S.M., 1977. Molecular evolution of human and rabbit beta-globin mRNAs. *PNAS* 74(12):5618-5622.
- Kennedy, K. A. R., Deraniyagala, S. U. & Kenneth, A. R., 1989. Fossil remains of 28,000-year-old hominids from Sri Lanka. *Current Anthropology* 30 (3): 394–399.
- Kivisild, T., Shen, P., Wall, D.P., Do, B., Sung, R., Davis, K., Passarino, G., Underhill, P.A., Scharfe, C., Torroni, A., Scozzari, R., Modiano, D., Coppa, A., de Knijff, P., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. & Oefner, P.J., 2006. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics* 172(1):373-87.
- Kondrashov, A. S., 2002. Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Human mutation*, 21:12-27.
- Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W.S., Sigurdsson, G., Walters, G.B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Helgason, A., Magnusson, O.T., Thorsteinsdottir, U. & Stefansson, K., 2012. Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488(7412):471-5.

- Kuroki, Y., Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T.D., Itoh, T., Kim, D.S., Kim, D.W., Choi, S.H., Kim, I.C., Choi, H.H., Kim, Y.S., Satta, Y., Saitou, N., Yamada, T., Morishita, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Park, H.S. & Fujiyama A, 2006. Comparative analysis of chimpanzee and human Y chromosomes unveils complex evolutionary pathway. *Nature Genetics* 38(2):158-67.
- Lahr, M. M. & Foley, R., 1994. Multiple dispersals and modern human origins. *Evolutionary Anthropology* 3: 48–60.
- Lalueza-Fox, C. & Gilbert, M. T. P., 2011. Paleogenomics of Archaic Hominins. *Current biology* 21(24): R1002- R1009.
- Langergraber, K.E., Prüfer, K., Rowney, C., Boesch, C., Crockford, C., Fawcett, K., Inoue, E., Inoue-Muruyama, M., Mitani, J.C., Muller, M.N., Robbins, M.M., Schubert, G., Stoinski, T.S., Viola, B., Watts, D., Wittig, R.M., Wrangham, R.W., Zuberbühler, K., Pääbo, S. & Vigilant L., 2012. Generation times in wild chimpanzees and gorillas suggest earlier divergence times in great ape and human evolution. *PNAS* 74(12):5618-5622.
- Li, W.H., Tanimura, M. & Sharp, P., 1987. An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian DNA sequences. *Journal of molecular evolution* 25:330-342.
- Loogväli, E.L., Kivisild, T., Margus, T. & Villems, R., 2009. Explaining the imperfection of the molecular clock of hominid mitochondria. *PLoS One* 4(12):e8260.
- Macaulay, V., Hill, C., Achilli, A., Rengo, C., Clarke, D., Meehan, W., Blackburn, J., Semino, O., Scozzari, R., Cruciani, F., Taha, A., Shaari, N.K., Raja, J.M., Ismail, P., Zainuddin, Z., Goodwin, W., Bulbeck, D., Bandelt, H.J., Oppenheimer, S., Torroni, A. & Richards M., 2005. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science* 308(5724):1034-6.
- Martin, A.P., 1995. Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 12:1124-1131.
- McVean, G.T. & Hurst, L.D., 1997. Evidence for a selectively favourable reduction in the mutation rate of the X chromosome. *Nature* 386(6623):388-92.
- Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., Arsuaga, J.L., Martínez, I., Gracia, A., de Castro, J.M., Carbonell, E. & Pääbo, S., 2014. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* 505(7483):403-6.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A. & Wallace, D.C., 2002. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS* 100(1):171-6.
- Nabholz, B., Glémin, S. & Galtier, N., 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals--the longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25(1):120-30.
- Nachman, M.W. & Crowell, S.L., 2000. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*, 156(1):297-304.

O'Connell, J., & Allen, J., 2004. Dating the colonization of Sahul (Pleistocene Australia–New Guinea): a review of recent research. *Journal of Archaeological Science* 31: 835–853.

Pritchard, J.K., Seielstad, M.T., Pérez-Lezaun, A. & Feldman, M.W., 1999. Population growth of human Y chromosomes: a study of Y chromosome microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* 16:1791–1798.

Rasmussen, M., Guo, X., Wang, Y., Lohmueller, K.E., Rasmussen, S., Albrechtsen, A., Skotte, L., Lindgreen, S., Metspalu, M., Jombart, T., Kivisild, T., Zhai, W., Eriksson, A., Manica, A., Orlando, L., De La Vega, F.M., Tridico, S., Metspalu, E., Nielsen, K., Ávila-Arcos, M.C., Moreno-Mayar, J.V., Muller, C., Dortch, J., Gilbert, M.T., Lund, O., Wesolowska, A., Karmin, M., Weinert, L.A., Wang, B., Li, J., Tai, S., Xiao, F., Hanihara, T., van Driem, G., Jha, A.R., Ricaut, F.X., de Knijff, P., Migliano, A.B., Gallego Romero, I., Kristiansen, K., Lambert, D.M., Brunak, S., Forster, P., Brinkmann, B., Nehlich, O., Bunce, M., Richards, M., Gupta, R., Bustamante, C.D., Krogh, A., Foley, R.A., Lahr, M.M., Balloux, F., Slicheritz-Pontén, T., Villems, R., Nielsen, R., Wang, J. & Willerslev, E., 2011. An Aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia. *Science* 334(6052): 94-98.

Reich, D., Green, R.E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E.Y., Viola, B., Briggs, A.W., Stenzel, U., Johnson, P.L., Maricic, T., Good, J.M., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Fu, Q., Mallick, S., Li, H., Meyer, M., Eichler, E.E., Stoneking, M., Richards, M., Talamo, S., Shunkov, M.V., Derevianko, A.P., Hublin, J.J., Kelso, J., Slatkin, M. & Pääbo S., 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468(7327):1053-60.

Roach, J. C., Glusman, G., Smit, A.F., Huff, C.D., Hubley, R., Shannon, P.T., Rowen, L., Pant, K.P., Goodman, N., Bamshad, M., Shendure, J., Drmanac, R., Jorde, L.B., Hood, L. & Galas, D.J., 2010. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science*: 328 (5978): 636–639.

Roberts, R. G., Jones, R. & Smith, M. A, 1990. Thermoluminescence dating of a 50,000 year-old human occupation site in northern Australia. *Nature* 345: 153–156.

Roberts, R. G., Jones, R., Spooner, N. A., Head, M. J., Murray, A. S. & Smith, M. A, 1994. The human colonisation of Australia: optical dates of 53,000 and 60,000 years bracket human arrival at Deaf Adder Gorge, Northern Territory, *Quaternary Science Reviews* 13: 575–583.

Roberts, R.G., Flannery, T.F., Ayliffe, L.K., Yoshida, H., Olley, J. M., Prideaux, G.J., Laslett, G.M., Baynes, A., Smith, M.A., Jones, R. & Smith, B.L., 2001. New ages for the last Australian megafauna: continent-wide extinction about 46,000 years ago. *Science* 292: 1888–1892.

Röhl, A., Brinkmann, B., Forster, L., Forster, P., 2001. An annotated mtDNA database. *International Journal of Legal Medicine* 115: 29-39.

Santos, C., Montiel, R., Sierra, B., Bettencourt, C., Fernandez, E., Alvarez, L., Lima, M., Abade, A. & Aluja, M.P., 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: A model using families from the Azores Islands (Portugal). *Molecular Biology and Evolution* 22:1490-1505.

Sanders, S. J., Murtha, M.T., Gupta, A.R., Murdoch, J.D., Raubeson, M.J., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., DiLullo, N.M., Parikshak, N.N., Stein, J.L., Walker, M.F., Ober, G.T., Teran, N.A., Song, Y., El-Fishawy, P., Murtha, R.C., Choi, M., Overton, J.D., Bjornson, R.D., Carriero, N.J., Meyer, K.A., Bilguvar, K., Mane, S.M., Sestan, N., Lifton, R.P., Günel, M., Roeder, K., Geschwind, D.H., Devlin, B. & State, M.W., 2012. *De novo* mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485 (7397): 237–241.

Scally, A. & Durbin, R., 2012. Revising the human mutation rate: implications for understanding human evolution. *Nature Review Genetics*, 13(10):745-53.

Shang, H., Tong, H., Zhang, S., Chen, F. & Trinkaus E., 2007. An early modern human from Tianyuan Cave, Zhoukoudian, China. *PNAS* 104(16):6573-8.

Shen, G., Wang, W., Wang, Q., Zhao, J., Collerson, K., Zhou, C. & Tobias, P.V., 2002. U-Series dating of Liujiang hominid site in Guangxi, Southern China. *Journal of human evolution* 43(6):817-29.

Stringer, C., 2012. Evolution: What makes a modern human. *Nature* 485: 33-35.

Soares, P., Ermini, L., Thomson, N., Mormina, M., Rito, T., Röhl, A., Salas, A., Oppenheimer, S., Macaulay, V. & Richards, M. B., 2009. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *American Journal of Human Genetics* 84(6): 740–759.

Soares, P., Alshamali, F., Pereira, J.B., Fernandes, V., Silva, N.M., Afonso, C., Costa, M.D., Musilová, E., Macaulay, V., Richards, M.B., Cerny, V. & Pereira, L. 2012. The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *Molecular Biology and Evolution* 29(3): 915 – 927.

Sun, C., Kong, Q.-P., Palanichamy, M., Agrawal, S., Bandelt, H.-J., Yao, Y.-G., Khan, F., Zhu, C.-L., Chaudhuri, T.K., and Zhang, Y.-P. ,2006. The dazzling array of basal branches in the mtDNA macrohaplogroup M from India as inferred from complete genomes. *Molecular Biology and Evolution* 23: 683–690.

Takahata N., 1986 An attempt to estimate the effective size of the ancestral species common to two extant species from which homologous genes are sequenced. *Genetical research* 48(3):187-190.

Takahata, N., Satta, Y. & Klein J., 1995. Divergence time and population size in the lineage leading to modern humans. *Theoretical population biology* 48(2):198-221.

Takahata, N. & Satta Y., 1997. Evolution of the primate lineage leading to modern humans: phylogenetic and demographic inferences from DNA sequences. *PNAS* 94(9):4811-4815.

Thorne, A., Grün, R., Mortimer, G., Spooner, N.A., Simpson, J.J., McCulloch, M., Taylor, L., Curnoe, D, 1999. Australia's oldest human remains: age of the LakeMungo 3 skeleton. *Journal of human evolution* 36 (6): 591–612.

Trinkaus, E., Milota, S., Rodrigo, R., Mircea, G. & Moldovan O., 2003. Early modern human cranial remains from the Peștera cu Oase, Romania. *Journal of human evolution* 45(3):245-53.

Turney, C. S.M., Bird, M.I., Fifield, L.K, Roberts, R.G., Smith, M., Dortch, C.E., Grün, R., Lawson, E., Ayliffe, L.K., Miller, G.H., Dortch, J. & Cresswell, R.G., 2001. Early human occupation at Devil's Lair, southwestern Australia 50,000 years ago. *Quaternary Research* 55: 3–13.

Wei, W., Ayub, Q., Chen, Y., McCarthy, S., Hou, Y., Carbone, I., Xue, Y. & Tyler-Smith, C., 2013. A calibrated human Y-chromosomal phylogeny based on resequencing. *Genome research* 23(2):388-95.

Xue, Y., Zhang, X., Huang, N., Daly, A., Gillson, C.J., Macarthur, D.G., Yngvadottir, B., Nica, A.C., Woodwark, C., Chen, Y., Conrad, D.F., Ayub, Q., Mehdi, S.Q., Li, P. & Tyler Smith, C., 2009. Population differentiation as an indicator of recent positive selection in humans: an empirical evaluation. *Genetics* 183(3):1065-77.

Zhivotovsky, L.A., Underhill, P.A., Cinniöglu, C., Kayser, M., Morar, B., Kivisild, T., Scozzari, R., Cruciani, F., Destro-Bisol, G., Spedini, G., Chambers, G.K., Herrera, R.J., Yong, K.K., Gresham, D., Tournev, I., Feldman, M.W. & Kalaydjieva, L., 2004. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *American Journal of Human Genetics* 74(1):50-61.

Academic Dictionaries and Encyclopedias[online]. Map of Sunda and Sahul [cit. 5. 5. 2014]. Dostupné z:  
[http://en.academic.ru/pictures/enwiki/77/Map\\_of\\_Sunda\\_and\\_Sahul.png](http://en.academic.ru/pictures/enwiki/77/Map_of_Sunda_and_Sahul.png)

### **Sekundární citace:**

Bowler, J.M. and A.G.Thorne, 1976. Human remains from Lake Mungo. In R.L. Kirk and A.G. Thome (eds) *The Origin of the Australians*, Canberra: A.I.A.S..

Libby, W. F. & Johnson, F., 1955. *Radiocarbon dating*. Chicago: University of Chicago Press

Martin, P. S. & Steadman, D.W., 1999. in *Extinctions in NearTime: Causes, Contexts, and Consequences*, New York : R. D. E. MacPhee, Ed. Kluwer Academic/Plenum.