



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

Martina VYSKOČILOVÁ

STERILITA HYBRIDNÍCH SAMCŮ MYŠI DOMÁCÍ

Disertační práce

Školitel: prom. biolog Jaroslav Piálek, CSc.

Brno, 2008

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: **Mgr. Martina Vyskočilová**

Název disertační práce: **Sterilita hybridních samců myši domácí**

Název disertační práce anglicky: **Hybrid male sterility in the house mouse**

Studijní program: **Biologie**

Studijní obor (směr), kombinace oborů: **Obecná a molekulární genetik**

Školitel: **prom. biolog Jaroslav Piálek, CSc.**

Rok obhajoby: **2008**

Klíčová slova v češtině: **speciace, sterilita hybridů, genová inkompatibilita, *Mus musculus*, inbrední kmeny, analýza QTL**

Klíčová slova v angličtině: **speciation, hybrid sterility, genetic incompatibility, *Mus musculus*, inbred strain, QTL analysis**



Samí toho zvládneme tak málo,
ale když se spojíme,
zvládneme cokoli.
(Helen Keller)

Poděkování

Mé poděkování patří především školiteli Jaroslavu Piálkovi za odborné rady, cenné připomínky a trpělivost, kterou mi věnoval. Děkuji rovněž všem svým kolegům a přátelům z oddělení populační biologie ÚBO AV ČR ve Studenci za poskytnutí skvělého zázemí pro práci a neocenitelnou pomoc při realizaci výzkumu. Zvláště pak děkuji Báře Bímové, Pepovi a Ani Bryjovým za jejich podporu, pomoc a optimismus v každé situaci. Velký dík patří Miloši Macholánovi a Zdeňkovi Trachtulcovi za konzultace a užitečné rady, kterými přispěli k vypracování této disertační práce. Děkuji Jiřímu Forejtovi za poskytnutí cenných informací a DNA markerů nezbytných pro vznik této práce. Děkuji také Andrei Vetešnickové Šimkové a všem z oddělení parazitologie PřF MU za toleranci a poskytnutí prostoru k psaní disertační práce.

Největší dík však patří celé mé rodině a Romanovi za neobyčejnou trpělivost, vstřícnost a podporu, kterou jsem často potřebovala.

Práce vznikla na základě finanční podpory grantů GA AV ČR IAA6093201, GA ČR 206/06/0955 a 206/06/0707.

ABSTRAKT

Sterilita hybridů je postzygotická reprodukční bariéra, která zabraňuje toku genetické informace mezi divergujícími populacemi. Studium genů podmiňujících sterilitu může být klíčem k porozumění, jakým způsobem probíhají počáteční fáze speciace. Lokus *Hst1* (*Hybrid sterility-1*), který leží na chromosomu 17, je zodpovědný za sterilitu hybridů myši domácí. Lokus *Hst1* byl poprvé popsán u samců z křížení divokých myší *Mus musculus musculus* odchycených v Praze s dvěma inbredními kmeny C57BL/10 (produkující sterilní hybridní samce) a C3H (fertilní hybridní samci), převážně odvozenými od *M. m. domesticus*. *Hst1* je tedy geneticky definován přítomností polymorfismu v genomu *M. m. domesticus*. V kříženích volně žijících myší *M. m. musculus* odchycených ve Studenci s kmenem C57BL/10 jsme prokázali přítomnost polymorfismu sterility asociované s lokusem *Hst1* i v jiné alopatrické populaci *M. m. musculus* a zaznamenali jsme existenci dalších polymorfních genů sterility hybridů. Pro studium genetického pozadí sterility hybridů jsme vytvořili inbrední linie STUS a STUF odvozené od *M. m. musculus*. Tyto linie při křížení s laboratorním kmenem C57BL/10 produkují hybridní potomstvo s odlišným fenotypovým projevem (sterilní nebo fertilní hybridní samci). Z křížení samic (STUS×STUF)_{F1} se samci C57BL/10 jsme získali jak fertilní, tak sterilní hybridní samce. Neplodní hybridní samci měli významně sníženou hmotnost varlat a nadvarlete s absencí spermií nebo malým počtem spermií. Histologická analýza řezů varlaty ukázala, že k zástavě spermatogeneze dochází v pachytenní/zygotenní fázi nebo je narušena spermiogeneze. QTL mapování ukázalo významný vliv chromosomu 17 a X na sterilitu hybridů. Je pravděpodobné, že genové inkompatibility asociované se samčí sterilitou se vyvíjely na chromosomu 17 nezávisle a jsou polymorfní nejen v genomu *M. m. domesticus*, ale i *M. m. musculus*. Nově odvozené linie STUS a STUF představují účinný nástroj pro studium genetického základu sterility hybridů a jejího projevu ve volně žijících populacích myši domácí.

ABSTRACT

Hybrid sterility is one of the postzygotic reproductive barriers that can prevent gene flow between diverging populations. Identification of sterility genes and their function is consequently demanded for understanding of processes that can ultimately lead to speciation. The sterility locus *Hst1* (*Hybrid sterility-1*) on chromosome 17 was originally described in hybrid progeny delivered in intersubspecific crosses between wild *Mus musculus musculus*, sampled at localities in Prague, and two classical laboratory strains C57BL/10 (producing sterile hybrid males) and C3H (producing fertile hybrid males), derived from *M. m. domesticus*; *Hst1* was defined by the presence of polymorphism in the *domesticus* genome. We confirmed that *Hst1*-related sterility is polymorphic in natural allopatric populations and noted additional polymorphic genes affecting hybrid sterility in crosses between wild *M. m. musculus* from Studenec and C57BL/10. To determine the genetic basis underlying male fertility, we derived two wild-origin *musculus* strains, STUS and STUF, producing alternative phenotypes in crosses with C57BL/10 mice (sterile and fertile males, respectively). From the cross of *musculus* (STUS × STUF)_{F1} females and C57BL/B10 we obtained both fertile and sterile hybrid males. Infertile hybrid males suffered from significantly reduced testes and epididymis size with no sperm or very low number of sperm in epididymis. Histology of testes showed that sperm development was arrested at the pachytene/zygotene stages of meiosis. Alternatively, spermiogenic defect was observed in the seminiferous tubules of some hybrid males. QTL analysis of the male progeny revealed significant male sterility loci on chromosomes 17 and X. The data suggest that genetic incompatibilities on chromosome 17 associated with male sterility have evolved independently and are polymorphic both within the *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* genomes. The new wild-derived inbred strains STUS and STUF represent an effective tool for elucidating the genetic basis of hybrid sterility and the geographical variation of hybrid sterility within natural populations of house mouse.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	8
2	SPECIACE A POSTZYGOTICKÉ BARIÉRY	9
2.1	SPECIACE	9
2.2	POSTZYGOTICKÉ BARIÉRY	10
2.2.1	<i>Inkompatibilita na úrovni chromosomů</i>	10
2.2.2	<i>Inkompatibilita na úrovni genů</i>	11
3	STERILITA HYBRIDŮ	13
3.1	STERILITA HYBRIDŮ	13
3.1.1	<i>Haldaneovo pravidlo</i>	14
3.1.2	<i>Velký efekt chromosomu X</i>	15
3.2	SPECIAČNÍ GENY	17
3.3	MYŠ JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS PRO STUDIUM STERILITY HYBRIDŮ	18
3.4	STERILITA HYBRIDŮ U MYŠI DOMÁCÍ.....	21
3.4.1	<i>Lokus Hst1</i>	21
3.4.2	<i>Sterilita asociovaná s chromosomem X</i>	23
3.4.3	<i>Další lokusy podmiňující sterilitu hybridů</i>	24
4	INBREDNÍ KMENY MYŠÍ A JEJICH VYUŽITÍ	25
4.1	„KLASICKÉ“ INBREDNÍ KMENY.....	25
4.2	„ČISTÉ“ INBREDNÍ KMENY	26
5	MAPOVÁNÍ QTL ODPOVĚDNÝCH ZA STERILITU HYBRIDŮ	29
5.1	MAPOVÁNÍ QTL	29
5.2	EXPERIMENTÁLNÍ KŘÍŽENÍ INBREDNÍCH LINÍ A ANALÝZA DAT	30
5.3	MAPOVÁNÍ QTL STERILITY HYBRIDŮ U <i>MUS MUSCULUS</i>	33
6	ZÁVĚR	35
7	PUBLIKACE TVOŘÍCÍ DISERTAČNÍ PRÁCI	37
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

1 CÍLE PRÁCE

Empirické studie naznačují, že ke speciaci dochází narušením epistatických interakcí mezi komplementárními geny způsobující neživotaschopnost nebo sterilitu hybridů. Vhodný savčí modelový objekt pro studium těchto genových interakcí představují dva poddruhy myši domácí, *Mus musculus musculus* a *M. m. domesticus*. Lokus *Hybrid sterility-1 (Hst1)* byl popsán v potomstvu z křížení volně žijících myši *M. m. musculus* odchycených Praze s laboratorními kmeny C57BL/10SnPh (sterilní samčí potomstvo) a C3H/DiSnPh (fertilní potomstvo), odvozených z *M. m. domesticus*. Geneticky je tento typ sterility definován polymorfismem mezi kmeny *M. m. domesticus*; o evoluci genů v genomu *M. m. musculus* způsobující inkompatibilitu mezi poddruhovými kříženci dosud chybí podrobnější informace. Vzhledem k tomu, že se oba poddruhy myši domácí setkávají a vytváří hybridní zónu, která prochází celou Evropou, existuje předpoklad, že by se gen *Hst1* mohl podílet na speciaci mezi oběma poddruhy myši.

Prvním cílem této disertační práce bylo potvrdit existenci polymorfismu sterility a otestovat geografickou proměnlivost genu *Hst1* v přírodních populacích *M. m. musculus*.

Druhým cílem byla příprava „čistých“ inbredních linií odvozených od volně žijících myši *M. m. musculus*, u kterých budou zafixovány alternativní alely genů odpovědných za sterilitu. Tyto linie bylo nutno charakterizovat mikrosatelitovými markery k umožnění budoucích QTL studií genů zodpovědných za genovou inkompatibilitu.

Posledním cílem této práce bylo genetické mapování lokusů podmiňujících samčí sterilitu u hybridů, kteří vznikli křížením dvou inbredních linií odvozených od *M. m. musculus* a laboratorního kmene C57BL/10.

2 SPECIACE A POSTZYGOTICKÉ BARIÉRY

2.1 Speciace

Druhová rozmanitost života na Zemi je výsledkem dvou protikladných evolučních procesů – speciace, v jejímž průběhu vzniká z původního druhu jeden nebo více druhů nových, a extinkce (vymírání) druhů. Zkoumání mechanismů a objevování genů a jejich specifických mutací, které se podílejí na vzájemném oddělování nově vznikajících druhů, je již po mnoho let v popředí zájmu evolučních biologů.

První úvahy o speciaci se objevily v polovině 19. století, kdy si Charles Darwin, Alfred Wallace a další biologové té doby uvědomili, že druhy jsou proměnlivé a mohou se v průběhu času vyvíjet. Zastávali na tu dobu odvážnou myšlenku, že nové druhy v evoluci vznikají divergencí ze společného předka, kdy za hybnou sílu evoluce byl považován hlavně přírodní výběr (selekce).

Období 30. a 40. let 20. století, kdy docházelo k postupnému propojení Darwinovy evoluční teorie s poznatky paleontologie a klasické genetiky, která po znovuobjevení Mendelových zákonů zažívala intenzivní rozvoj, se označuje jako neodarwinismus nebo také období Moderní syntézy. Hlavní představitelé neodarwinismu, genetik T. Dobzhansky, zoolog E. Mayr a další, významně ovlivnili chápání toho, co vlastně druhy jsou a jak mohou vznikat. V té době vznikla jedna z nejužnějších, a dodnes používaná, Mayrova definice "biologického druhu" („biospecies“). Za biologický druh se považuje skupina vzájemně se přirozeně křížících populací reprodukčně izolovaných od ostatních takových skupin (Mayr, 1942). Podstatou koncepce biologického druhu je existence reprodukčních bariér, které zabraňují křížení vzájemně odlišných populací (Dobzhansky, 1937). Mechanismy, které umožňují reprodukční oddělení části populace a zabraňují toku genetické informace, můžeme rozdělit na mechanismy snižující pravděpodobnost vzniku hybridních zygot (prezygotické bariéry), jako např. vnější a vnitřní gametická neslučitelnost, sexuální a etologický nesoulad, a na mechanismy snižující pravděpodobnost vývoje zygot v dospělém, reprodukce schopného jedince (postzygotické bariéry), jako např. sterilita, snížená plodnost nebo neživotaschopnost hybridů (Coyne & Orr, 2004; Flegel, 2005). V první polovině minulého století byl postulován Dobzhanského-Mullerův model speciace, který vysvětluje vznik reprodukčně izolačních mechanismů na základě genové inkompatibility a možných epistatických interakcí (Dobzhansky, 1937; Muller, 1942).

Po téměř čtyřiceti letech mírného pokroku v oblasti studia speciace umožnil rozmach molekulárně genetických metod v 80. letech obrátit pozornost evolučních biologů na zkoumání genetických základů reprodukční izolace. Byly učiněny první odhady počtu genů, které se účastní vzniku reprodukčních bariér a začala být zjišťována jejich poloha v genomu (Coyne & Orr, 1989; Orr, 1995). V této době se objevila řada populačně genetických modelů speciace, které umožnily vytvářet nové predikce týkající se evoluce reprodukčních bariér (Orr, 1995; Gavrilets, 1997; Turelli & Orr, 2000; Hey & Machado, 2003; Barton *et al.*, 2007). Díky neustálému zdokonalování a vývoji nových molekulárních metod, kdy známe sekvenční genomů celé řady organismů a jsme schopni identifikovat jednotlivé geny, jejich transkripty a vliv na fenotyp, se nám otvírají nové možnosti studia speciace a hledání odpovědí na otázky, které genetické procesy provázejí vznik nových druhů.

2.2 Postzygotické bariéry

Vytvoření reprodukčních bariér bývá u pohlavně se rozmnožujících druhů kritickým a zřejmě i prvním krokem speciace. Postzygotické reprodukčně izolační mechanismy se uplatňují v případě, kdy sice po oplození vzniká zygota, ale výsledné hybridní potomstvo má sníženou reprodukční zdatnost nebo fertilitu (Coyne & Orr, 2004). Historicky se rozlišují tři možné příčiny ovlivňující reprodukční zdatnost (fitness): chromosomové přestavby, různý stupeň ploidie a inkompatibilita na úrovni genů (Coyne & Orr, 1998). Jelikož polyploidizační speciace probíhá především u rostlin, nebude v této práci dále diskutována (pro další informace např. Ramsey & Schemske, 1998).

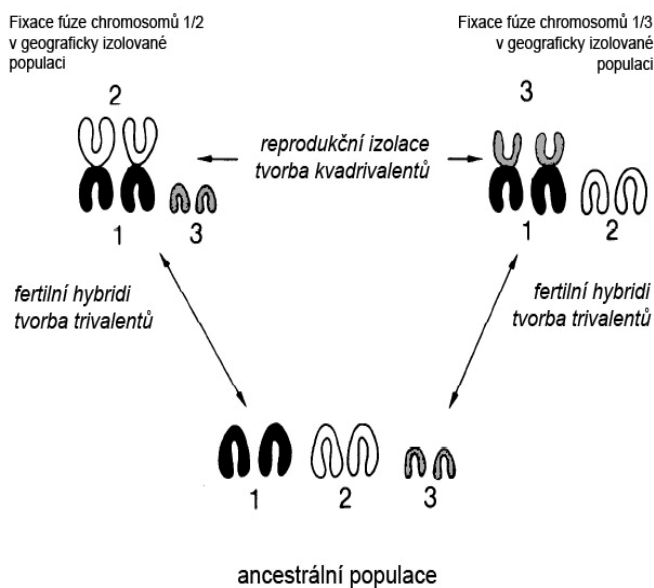
2.2.1 Inkompatibilita na úrovni chromosomů

Vlivem chromosomové mutace se mění struktura nebo počty chromosomů v karyotypu. To má za následek, že při pohlavním rozmnožování, zejména v průběhu meiózy, jsou nový a starý karyotyp částečně nebo zcela inkompatibilní. Výsledkem je snížená plodnost nebo úplná sterilita hybridů, která vytváří účinnou postzygotickou reprodukční bariéru (Flegr, 2005).

Za jednu z nejčastějších chromosomových mutací je považována Robertsonova (robertsonská) translokace (Robertson, 1916), kdy dochází k fúzi dvou akrocentrických chromosomů za vzniku jednoho metacentrického chromosomu a celkově se tak mění počet chromosomů v karyotypu (obr. 1). U savců jsou Robertsonovy translokace nejlépe prostudované u západoevropských populací poddruhu myši domácí *M. m. domesticus*

(Hauffe, 1993; Piálek *et al.*, 2001, 2005), a u rejska obecného *Sorex araneus* (přehled např. Wojcik *et al.*, 2002). U heterozygotních hybridů, kteří vznikli různou kombinací robertsonských metacentriků, dochází v důsledku meiotických nondisjunkcí k významnému snížení fertility.

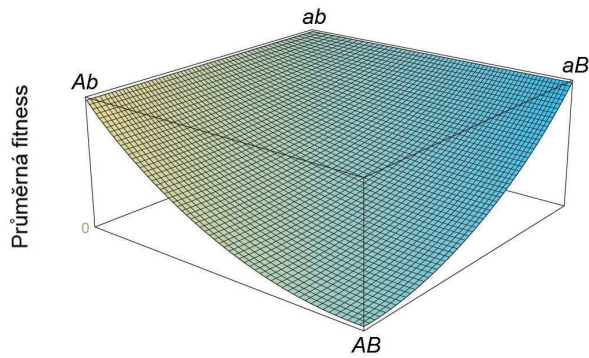
Přestože mnoho biologů zastává názor, že chromosomové mutace mají při speciaci podstatný význam, na základě genetických analýz se ukazuje, že postzygotické bariéry jsou u savců způsobeny spíše inkompatibilitou genů, než rozsáhlými chromosomovými přestavbami (Perez, 1993; Coyne & Orr, 1998, 2004).



Obr. 1: Teoretický model evoluce robertsonské translokace. V geograficky izolovaných populacích dochází k fúzi akrocentrických chromosomů 1, 2, 3 v různých kombinacích. Hybridi mezi původní a odvozenou populací budou fertilní, protože u živočichů vznik trivalentů v průběhu meiózy nepředstavuje zásadní problém a často dochází k normální segregaci chromosomů. Hybridi mezi odvozenými populacemi budou mít sníženou fertilitu nebo budou sterilní, protože chromosom 1 je obsažen v obou centrických fúzích (tzv. monobrachiální homologie). V průběhu meiózy bude docházet ke tvorbě multivalentů znemožňujících správnou disjunkci homologních chromosomů. Vymizení původního karyotypu způsobí přerušení toku genetické informace. Upraveno dle Baker & Bickham (1986).

2.2.2 Inkompatibilita na úrovni genů

Model popisující evoluci sterility a neživotaschopnosti hybridů na úrovni genů nezávisle na sobě navrhli Dobzhansky (1937) a Muller (1942). Podle Dobzhanského-Mullerova modelu (dále D-M model) vznik reprodukčních bariér způsobují epistatické interakce genů, jejichž vzájemné kombinace jsou v důsledku kumulace odlišných mutací škodlivé nebo neslučitelné (obr. 2). Produkty některých genů jednoho druhu nemohou správně spolupracovat s produkty genu druhu druhého, takže u hybridů vznikají nefunkční molekulární komplexy a na úrovni organismu nefunkční orgány (Coyne & Orr, 2004; Flegr, 2005). V případě inkompatibility na úrovni genů bývají v první řadě postiženy funkce spojené s rozmnožováním, tedy plodnost a reprodukční zdatnost hybridů.



Obr. 2: Dobzhanského-Mullerův model speciace. Ancestrální populace má genotyp $aabb$. Po rozdělení na dvě izolované populace např. geografickou bariérou, dojde k mutaci genu a u jedné populace, mutaci genu b u druhé populace a postupné fixaci nově vzniklých alel A a B za vzniku genotypů $AAbb$ a $aaBB$. Nově vzniklé mutace alel A a B jsou kompatibilní s genetickým pozadím, na kterém vznikly, aniž by ovlivnily fitness jedince. Tyto mutace však nemusí být kompatibilní mezi sebou (D-M inkompatibilita), protože během divergence nikdy nebyly přítomny u stejného jedince a jejich vzájemná

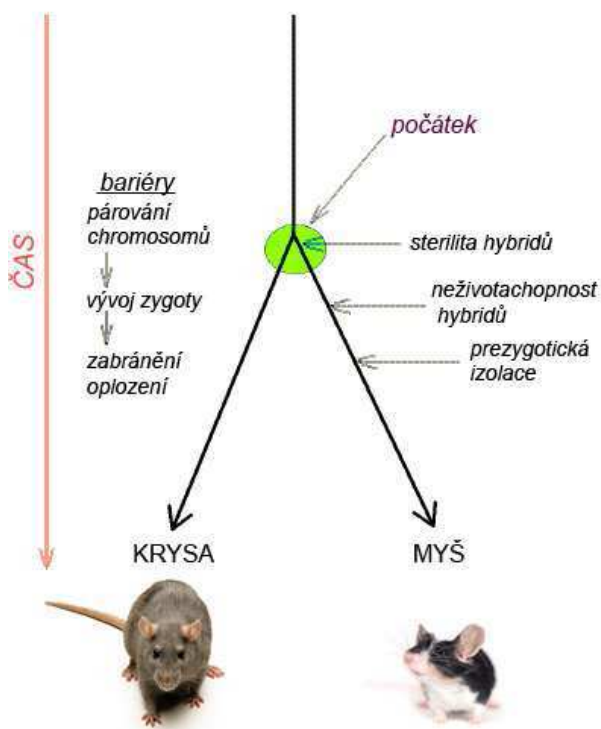
kompatibilita tedy nebyla nikdy testována přírodním výběrem. Po kontaktu obou izolátů se mohli zkřížit jedinci populace $AAbb$ a $aaBB$ a objeví se sterilní nebo neživotaschopné hybridní potomstvo $AaBb$. Na obrázku je znázorněna adaptivní krajina, která ukazuje závislost fitness jedinců náhodně se pářící populace na frekvenci alel dvou lokusů. Pro zjednodušení jsou genotypy uvedeny jako haplotypy. Převzato z Barton *et al.* (2007).

Platnost tohoto modelu podporují mnohé poznatky (Coyne & Orr, 2004), které zahrnují také studie specifických genů mající podíl na sterilitě hybridů (Ting *et al.*, 1998) a na neživotaschopnosti hybridů (Wittbrodt *et al.*, 1989; Presgraves *et al.*, 2003; Brideau *et al.*, 2006; Harrison & Burton, 2006). Síla reprodukční bariéry může záviset na míře, v jaké jsou jednotlivé genové inkompatibilita zafixovány mezi divergujícími populacemi. Teoretické studie D-M modelu předpokládají okamžitou fixaci inkompatibilní mutace v populaci (Orr, 1995; Turelli & Orr, 2000 a další). Existují však studie popisující vnitrodruhové rozdíly v míře postzygotické izolace jak u rostlin (Stebbins, 1958; Christie & Macnair, 1987; Sweigart *et al.*, 2007 a další), tak u živočichů (Gordon, 1927; Patterson & Stone, 1952; Forejt & Iványi, 1975; Wade & Johnson, 1994; Reed & Markow, 2004; Shuker *et al.*, 2005; Vyskočilová *et al.*, 2005; Demuth & Wade, 2007; Vyskočilová *et al.*, odesláno a další). Pouze několik málo studií se však zaměřuje na zkoumání polymorfismu možných D-M inkompatibilit v přírodních populacích (Forejt & Iványi, 1975; Christie & Macnair, 1987; Vyskočilová *et al.*, 2005; Sweigart *et al.*, 2007; Vyskočilová *et al.*, odesláno). Cílem této disertace bylo posunout studia zkoumání postzygotických bariér od laboratorních kmenů k volně žijícím myším.

3 STERILITA HYBRIDŮ

3.1 Sterilita hybridů

Sterilita hybridů je postzygotická reprodukční bariéra, která zabraňuje toku genetické informace mezi divergujícími populacemi v raném stádiu speciace u různých organismů (Coyne & Orr, 1998; Howard *et al.*, 2002; obr. 3). Sterilita hybridů je charakteristická dvěma projevy. Prvním je Haldaneovo pravidlo, které říká, že v hybridním potomstvu jsou sterilitou, snížením plodnosti nebo životaschopnosti zpravidla více postiženi zástupci heterogametického pohlaví (Haldane, 1922). U octomilky a savců jsou heterogametickým pohlavím samci (kombinace pohlavních chromosomů je označována XY), zatímco u ptáků a motýlů (*Lepidoptera*) pak samice (ZW). Za druhé je to velký efekt chromosomu X na vznik samčí sterility hybridů („large X-effect“) (Coyne & Orr, 1989).



Obr. 3. Možný časový sled vývoje reprodukčních bariér u savců. Krysa a myš se nemohou spolu pářit, jsou tedy reprodukčně zcela izolovány. Je však nepravděpodobné, že tato forma reprodukční bariéry by byla zodpovědná za počátek speciace. Před vytvořením prezygotických reprodukčních bariér mohlo dojít k páření jejich předků a vzniku hybridní zygoty. Pokud byly populace předků od sebe odděleny dostatečně dlouhou dobu, postupně nakumulované genetické rozdíly mohou způsobit, že produkty genů pocházejících z různých genomů nemohou spolu správně spolupracovat a dochází k poruchám při vývoji zygoty, tedy neživotaschopnosti hybridů. Ve většině případů však nepatří tyto bariéry zabráňující vývoji zygot ke spouštěcím mechanismům speciace. Při jejich absenci může vznikat životaschopné hybridní potomstvo. Tito potomci však mohou být v důsledku prvotních změn v rodičovském genomu sterilní, kdy následkem inkompatibilit na úrovni genů nebo chromosomů dochází k poruchám homologního párování chromosomů v průběhu meiózy. V případě, že by tyto změny v genomu byly evolučně fixovány, měli by všichni hybridní zhruba stejně sníženou plodnost. Ve skutečnosti mnohé nové změny v genomu přetrvávají v populaci dlouho dobu současně se starými. Proto se hybridní jedinci mohou navzájem dost lišit i v rámci stejné rodiny stupněm snížení své plodnosti a

vzniká potomstvo jak plně sterilní, tak fertilitní. Výskyt hybridů se sníženou fertilitou patří mezi první projevy druhové divergence. Snížením plodnosti (sterilitou) jsou zpravidla v hybridním potomstvu více postiženi zástupci heterogametického pohlaví (Haldaneovo pravidlo), i když se později projeví u obou pohlaví. Existence postzygotické bariéry tak může vytvářet selekční tlak na vznik prezygotických reprodukčních bariér. Upraveno dle Forsdyke (2000).

3.1.1 Haldaneovo pravidlo

Platnost Haldaneova pravidla byla opakovaně prokázána u mnoha druhů náležících k různým taxonům (Turelli, 1998; Forsdyke, 2000; Coyne & Orr, 2004). Proto byla objasnění mechanismů vzniku Haldaneova pravidla, a tedy možným příčinám sterility hybridů, věnována velká pozornost. Studie, prováděné v naprosté většině u octomilky, ukázaly, že Haldaneovo pravidlo je způsobeno kombinací většího počtu faktorů (Coyne & Orr, 2004).

První možné vysvětlení Haldaneova pravidla přinesla teorie dominance („dominance theory“). Tato teorie předpokládá, že za vznik inkompatibilit mezi rodičovskými genomy jsou odpovědné interakce recesivní povahy mezi geny na autosomech a geny na chromosomu X (Muller, 1942; Turelli & Orr, 2000; Coyne & Orr, 2004). V rámci různých druhů se inkompatibility recesivních alel hromadí rychleji než u dominantních alel (True *et al.*, 1996; Masly & Presgraves, 2007). Sterilita se potom projeví u heterogametického pohlaví, protože má pohlavní chromosom X jen v jedné kopii. Platnost této teorie potvrzuje celá řada experimentálních studií (přehled viz Masly & Presgraves, 2007).

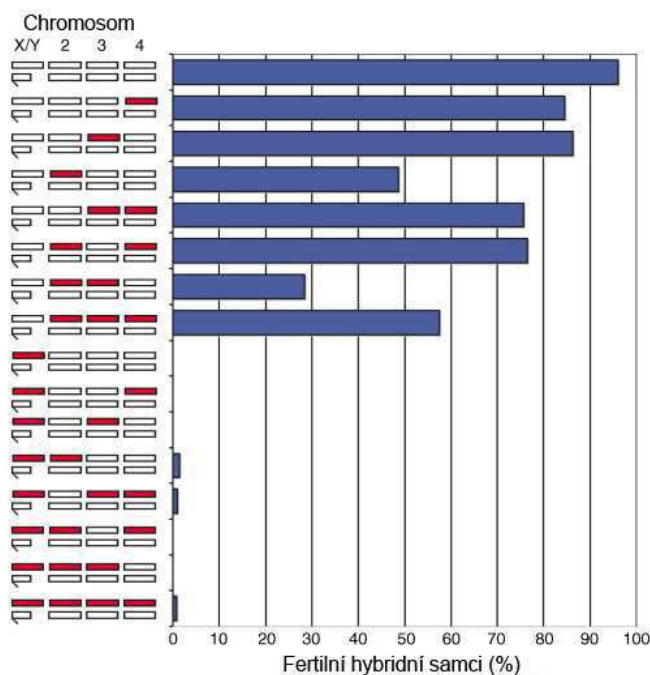
Druhým faktorem je tzv. teorie rychlejších samců („faster-male theory“), která předpokládá, že inkompatibility způsobující sterilitu samců se kumulují rychleji než ty, které vedou ke sterilitě samic (Wu & Davis, 1993; True *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 2003). Rychlejší evoluce samců než samic může být způsobena intenzivnější kompeticí během pohlavního výběru. To vede k rychlejší evoluci samčích genů ve srovnání se samicími a větší pravděpodobnosti výskytu sterility u hybridních samců (Wu & Davis, 1993). Genetické studie z poslední doby tuto teorii potvrzují a ukazují, že u genů s preferenční expresí u samců probíhá adaptivní evoluce rychleji na úrovni sekvence DNA a exprese než u genů exprimovaných pouze u samic nebo genů exprimovaných u obou pohlaví ve stejné míře (Michalak & Noor, 2003; Ellegren & Parsch, 2007). Navíc spermatogeneze jako taková je zřejmě obecně citlivější k poruchám než oogeneze (Hunt & Hassold, 2002). Přestože se efekt rychlejších samců při vzniku Haldaneova pravidla s velkou pravděpodobností uplatňuje, musí mít slabší účinek než efekt dominance (True *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 2003). Jinak by u organismů s pohlavními chromosomy ZW byly sterilitou postiženy nejen hybridní samice, ale i samci, jak by se podle teorie rychlejších samců očekávalo.

Haldaneovo pravidlo může být důsledek rychlejší evoluce chromosomu X, který se shrnuje pod název velký efekt chromosomu X a bude popsán v následující kapitole.

3.1.2 Velký efekt chromosomu X

Při studiu sterility hybridů pomocí zpětných křížení se ukázalo, že přenos chromosomu X z jednoho druhu na genetické pozadí druhého druhu, má nepoměrně větší vliv na fitness hybridů ve srovnání s autosomy (Coyne & Orr, 1989; obr. 4). Silný účinek chromosomu X na sterilitu hybridů, nověji nazývaný jako „Coynovo pravidlo“ (Turelli & Moyle, 2007), podporuje i fakt, že pohlavní chromosomy zpravidla v mnohem omezenější míře přecházejí přes hybridní zónu (viz kap. 3.3) než autosomy (Hagen & Scriber, 1989; Tucker *et al.*, 1992; Dod *et al.*, 1993; Raufaste *et al.*, 2005; Macholán *et al.*, 2007a). Chromosom X má větší obsah genů odpovědných za mezidruhovou inkompatibilitu (Charlesworth *et al.*, 1987; Coyne & Orr, 1989; Wu & Davis, 1993; Masly & Presgraves, 2007) a nese nenáhodný obsah genů s preferenční či výlučnou expresí v jednom pohlaví. Například myší chromosom X při porovnání s autosomy obsahuje méně genů exprimovaných ve spermatogenních buňkách během meiózy a je obohacen o geny, které jsou přednostně exprimované ve vaječnicích, placentě, somatických buňkách varlete nebo ve spermatogenních buňkách před meiózou (Wang *et al.*, 2001; Khil *et al.*, 2004; Divina *et al.*, 2005).

V současné době existují tři hlavní evoluční hypotézy, které se snaží velký efekt chromosomu X vysvětlit a které jsou převážně podpořeny poznatky získanými studiem octomilky (pro přehled viz Presgraves, 2008).



Obr. 4: Velký efekt chromosomu X u hybridů octomilky. Chromosom X má zjevně velký vliv na vznik sterility u hybridů, kteří vznikli ze zpětných křížení mezi *D. pseudoobscura* (bílé chromosomy) a *D. persimilis* (červené chromosomy). Na ose X je uvedeno procento fertálních hybridních samců, na ose Y jejich genotyp. Tento jev byl pozorován u celé řady dalších organismů, včetně savců, motýlů a ptáků (Coyne & Orr 1989). Převzato z Coyne & Orr (2004).

První je teorie rychlejšího X („faster-X theory“), která předpokládá rychlejší evoluci genů na chromosomu X způsobené častější fixací recesivních mutací na tomto chromosomu ve srovnání s autosomy (Charlesworth *et al.*, 1987; avšak Betancourt *et al.*, 2002; Thornton *et al.*, 2006). Přítomnost recesivní mutace se v heterozygotním stavu na autosomech neprojeví, protože její efekt je maskován standardní alelou na druhém chromosomu. Přítomnost recesivní mutace se ale projeví na jediném chromosomu X samců a může okamžitě podléhat selekci.

Teorie rychlejšího X by také mohla vysvětlit vznik Haldaneova pravidla a to za předpokladu, že hybridní inkompatibility budou na chromosomu X působit recesivně a že se rychlejší evoluce chromosomu X týká výhradně genů exprimovaných u heterogametického pohlaví (Orr, 1997; Coyne & Orr, 2004)

Druhým možným vysvětlením velkého efektu chromosomu X by mohl být meiotický tah („meiotic drive“; Coyne & Orr, 2004; Presgraves, 2008). Za odchylky od náhodné segregace chromosomů v průběhu meiózy mohou být zodpovědné sobecké genetické elementy, které zničí nebo poškodí gametu, která nese alternativní alelu. Výsledkem meiotického tahu při spermatogenezi je u heterogametického samce celkově menší počet spermií, které nesou převážně alelu způsobující tento efekt. Protože sobecké chování alel odpovědných za meiotický tah zpravidla snižuje plodnost jejich nositele, bývají jejich účinky potlačeny. Může však nastat případ, kdy v oddělených populacích dochází k fixaci jiných alel, které způsobují meiotický tah, než alel, které jeho účinky potlačují. Pokud se tato nevyvážená sestava alel setká v hybridním jedinci, mohlo by v extrémním případě dojít k vzájemnému zničení spermií. Vzhledem k tomu, že meiotický tah je převážně způsoben společným působením více alel různých genů, budou se faktory odpovědné za meiotický tah snadněji fixovat v oblastech se sníženou rekombinací, ke kterým patří inverze nebo pohlavní chromosomy, které u heterogametického pohlaví rekombinují ve značně omezené míře (Hurst *et al.*, 1996).

U octomilky je znám tzv. SD-systém („segregation distortion“), který se podílí na kompetici spermií a většina faktorů způsobujících meiotický tah se nachází na chromosomu X (Jaenike, 2001). U myši byl popsán tzv. *t*-haplotyp, který se nachází v proximální části chromosomu 17 a je charakteristický čtyřmi inverzemi (Klein *et al.*, 1984; Siver, 1995). V této oblasti s potlačenou rekombinací se nápadně často vyskytují geny odpovědné za sterilitu hybridů (Forejt *et al.*, 1991; Pilder *et al.*, 1991, 1993; Trachtulec *et al.*, 1994; Pilder, 1997; Elliot *et al.*, 2004). Genetické mapování genů na chromosomu X podmiňující sterilitu hybridních samců myši domácí naznačilo přítomnost inverze v lokusu, který vykazoval největší vliv na sterilitu samců (Storchová *et al.*, 2004).

Myšlenka, že za vznik sterility hybridů by mohl být odpovědný meiotický tah, nachází v poslední době silnou podporu, protože objasňuje nejen velký efekt chromosomu X, ale je i možným vysvětlením Haldaneova pravidla, což také potvrzují nové empirické studie (Tao *et al.*, 2003; Masly & Presgraves, 2007; Orr *et al.*, 2007).

Třetí hypotéza, která vysvětluje velký vliv chromosomu X na vznik sterility hybridů, klade důraz na epigenetické modifikace chromosomu X v zárodečných buňkách. Během počátečních fází spermatogeneze prochází chromosom X u heterogametických samců meiotickou inaktivací (Lifschytz & Lindsley, 1972; pro přehled viz Turner, 2007). V případě, že cizorodý chromosom X z jednoho druhu není správně rozpoznán inaktivačním aparátem jiného druhu jako genetický materiál chromosomu X, může dojít k narušení meiotické inaktivace a následně sterilitě hybridních samců (Masly & Presgraves, 2007). Inaktivace chromosomu X v zárodečných buňkách byla prokázána u řady organismů včetně octomilky (Lifschytz & Lindsley, 1972; pro přehled viz Presgraves, 2008), vačnatců (Namekawa *et al.*, 2007), háďátka (Kelly *et al.*, 2002) a myši (McCarrey *et al.*, 2002). U myši byl také dobře zdokumentován vliv inaktivace na genový obsah chromosomu X (Khil *et al.*, 2004; Divina *et al.*, 2005).

3.2 Speciační geny

V přírodě je mnohem častější sterilita hybridů, případně jejich potomstva, než jejich neživotaschopnost (Johnson & Kliman, 2002) a evoluce sterility hybridů probíhá rychleji než evoluce neživotaschopnosti hybridů (Presgraves, 2002; Orr *et al.*, 2004). Právě studium mechanismů vzniku sterility hybridů může pomoci objasnit průběh speciace podmíněné genovou inkompatibilitou.

Geny, které vlivem D-M inkompatibilit snižují fitness hybridů, se často označují jako „speciační“. Jak již bylo zmíněno, mezi hlavní mechanismy, které mohou vést k divergenci speciačních genů, patří pohlavní výběr a genetické konflikty (meiotický tah) (Orr & Presgraves, 2000; Orr *et al.*, 2004). Otázkou ovšem zůstává, které konkrétní geny u hybridů sterilitu způsobují a jaká je jejich normální funkce. Do současné doby bylo popsáno několik speciačních genů u různých organismů, včetně octomilky (přehled viz Orr *et al.*, 2004) a myši (viz kap. 3.4), o jejich přesné funkci však víme velmi málo.

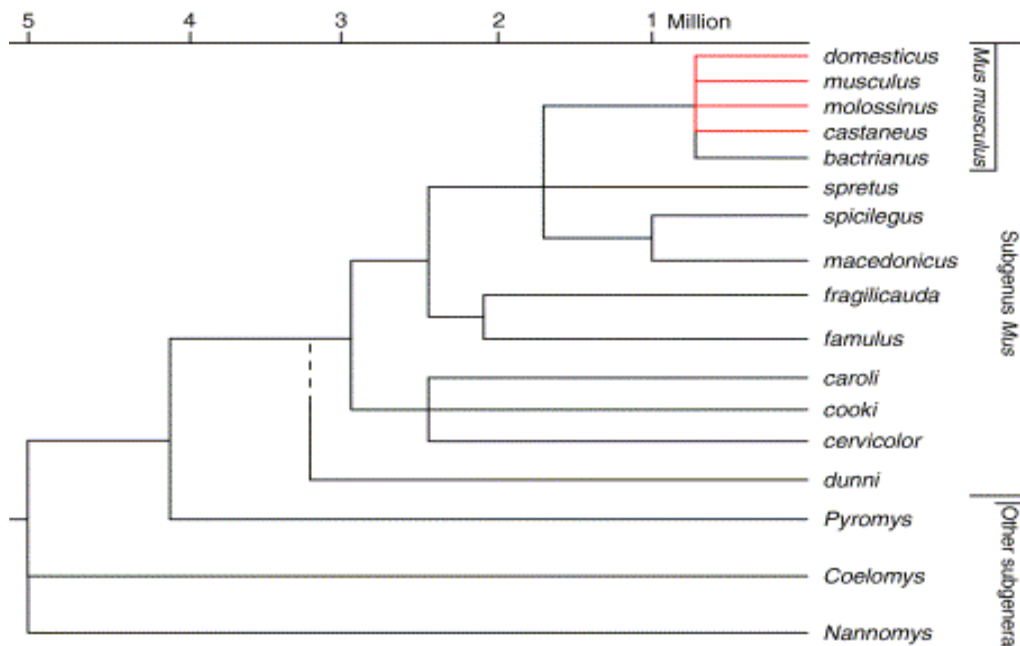
První, nejznámější a nejlépe prostudovaný speciační gen byl popsán u octomilky a nese mytologický název *Odysseus* (*Ods*) (Perez *et al.*, 1993). Lokus *Ods*, který se nachází se na chromosomu X, obsahuje gen kódující homeoboxový transkripční faktor nazvaný *OdysseusH*

(*OdsH* - *Odysseus site homeobox*) a je exprimovaný ve varlatech, jeho přesná funkce však není známa (Perez *et al.*, 1993; Perez & Wu, 1995). *OdsH* vznikl pravděpodobně duplikací genu *unc-4*, exprimovaného v nervových buňkách, a jeho sekvence, exprese a nová funkce v rámci reprodukční izolace prochází rychlým vývojem (Ting *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2004). Oproti *OdsH* je sekvence genu *unc-4* konzervovaná nejen u octomilky, ale dokonce i u savců a u hlístic (Ting *et al.*, 1998). Je zajímavé, že za posledních půl milionu let vzniklo v samotné homeodoméně *OdsH* tolik aminokyselinových substitucí, kolik by se očekávalo v průběhu 700 miliónů let. Vychýlený poměr nesynonymních ku synonymním substitucím odhalil, že tento gen je vystaven velmi silné pozitivní selekci. Samci s vyřazeným (tzv. *knock-out*) genem *OdsH* byli plodní, pouze v mládí měli snížený počet spermií (Sun *et al.*, 2004). *OdsH* je sice „postradatelný“ gen, který není potřeba pro životaschopnost a plodnost jedince daného druhu, ale hraje významnou roli v evoluci, protože je náchylný k divergenci své funkce během vzniku jednotlivých kládů rodu *Drosophila*.

Studium speciálních genů tak může být klíčem k porozumění, jakým způsobem probíhají počáteční fáze divergence druhů.

3.3 Myš jako modelový organismus pro studium sterility hybridů

Genetická struktura a molekulární mechanismy sterility hybridů doposud nejsou, navzdory neustále probíhajícím molekulárně genetickým analýzám, dostatečně objasněny. Mnoho poznatků o sterilitě hybridů vychází ze studia oblíbeného modelového organismu, octomilky (Coyne & Orr, 2004; Orr *et al.*, 2004; Sawamura *et al.*, 2004; Orr, 2005; Masly & Presgraves, 2007). Na základě experimentálních mezidruhových křížení bylo dokumentováno, že geny způsobující sterilitu nebo neživotaschopnost hybridů jsou v rámci druhů fixovány (Coyne & Orr, 2004). Je však podstatné, že ve většině případů byly použity druhy geneticky vzdálené, které by se za normálních okolností v přírodě nekřížily (Orr & Presgraves, 2000). Nelze také zanedbat tzv. efekt sněhové koule („snowball effect“), který předpokládá, že očekávaný počet D-M inkompatibilit v hybridech narůstá rychleji než lineárně s rostoucím počtem mutací v genomu divergujících druhů (Orr, 1995; Orr & Turelli, 2001). Proto je jakékoliv zobecňování problematické, protože takto získané poznatky mohou odrážet procesy probíhající v pozdním stádiu speciace nebo dokonce po završení tohoto procesu, tedy v důsledku existující reprodukční izolace. V této situaci zpravidla nelze odlišit příčiny od důsledků speciace.



Obr. 5: Schematické znázornění fylogeneze rodu *Mus*. Tento rod se oddělil zhruba před 5 miliony let a je tvořen podrody: *Mus*, *Pyromys*, *Coelomys* a *Nanomys*. V rámci podrodu *Mus* se nejprve oddělila linie vedoucí k dnešnímu druhu *M. terricolor* z Indie, Nepálu, Pákistánu a Bangladéše (na obrázku pod nesprávným označením *M. dunni*, které je mladším synonymem *terricolor*). Zhruba před 3 milióny let se oddělila skupina druhů *M. cervicolor*, *M. cookii* a *M. caroli* a druhá linie obsahující jak tzv. „palearktickou“ skupinu včetně komplexu myši domácích, tak dvojici asijských druhů, *M. famulus* z Indie, teprve nedávno zařazenou do podrodu *Mus* (Chevret *et al.*, 2003), a před časem objevený druh *M. fragilicauda* z Thajska (Auffray *et al.*, 2003). „Palearktická“ skupina se objevila asi před 1,5 milionem let; přestože ekologicky velmi podobná ostatním exoantropním druhům *M. macedonicus*, *M. spicilegus* a *M. cyriacus* (na obrázku neznázorněn), většina molekulárních analýz ukazuje na rané odštěpení druhu *M. spretus*, který je tak sesterskou skupinou všech ostatních zástupců tohoto kládu včetně domácích myší. Na obrázku jsou červeně vyznačeny taxony, od kterých jsou odvozeny laboratorní kmeny myší (viz kap. 4.1). Převzato z Guénet & Bonhomme (2003).

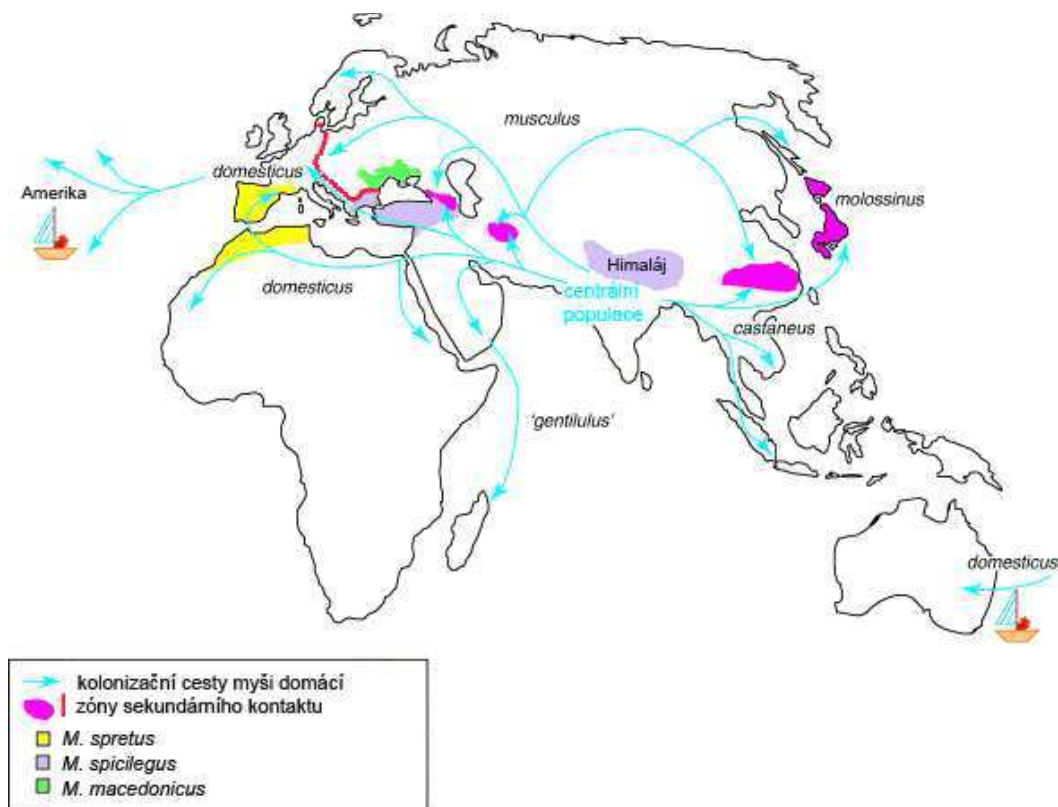
Jedním z nejvhodnějších savčích modelových organismů pro studium postzygotických bariér, které se uplatňují v raném stádiu speciace, je bezesporu myš domácí (*Mus musculus*). Jde o komplex forem, které jsou vzhledem k neúplné reprodukční izolaci zpravidla považovány za poddruhy (Auffray *et al.*, 1990; Musser & Carleton, 2005; obr. 5), někteří autoři je však považují za samostatné druhy (např. Sage *et al.*, 1993; Prager *et al.*, 1998). Tyto formy, které se oddělily od společného předka zhruba před půl milionem let (Boursot *et al.*, 1993; Prager *et al.*, 1998; Macholán *et al.*, odesláno), tvoří monofyletickou skupinu, charakteristickou synantropním způsobem života. Patří sem *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*, *M. m. gentilulus* a nově objevený, dosud oficiálně nepopsaný poddruh *M. m. socotranus* (Macholán *et al.*, odesláno). Komplex domácích myší je blíže příbuzný dalším druhům, žijícím exoantropně, tedy nezávisle na člověku: *M. spretus*, *M. spicilegus*, *M. macedonicus* a nově popsany druh *M. cyriacus* (Orth *et al.*, 2002; Cucchi *et*

al., 2006), který sdílí společného předka s *M. macedonicus* (Orth *et al.*, 2002; Macholán *et al.*, 2007b). Z nedostatku vhodnějšího termínu bývá celý tento klád nepřesně označován jako „palearktická skupina“ (Lundrigan *et al.*, 2002; Tucker *et al.*, 2005).

Poddruhy *M. musculus* vznikly pravděpodobně na severu indického kontinentu (Boursot *et al.*, 1996; pro odlišnou hypotézu viz Prager *et al.*, 1998) a jejich rozšíření po světě je spjato s člověkem (obr. 6). Se zavedením zemědělství po skončení poslední doby ledové osídlila *M. m. castaneus* jihovýchodní Asii a přilehlé ostrovy. *M. m. musculus* kolonizovala skoro celou Asii a východní Evropu. Nejdále se rozšířila *M. m. domesticus*, která se nejdříve přes Blízký východ dostala do severní Afriky, jižní a západní Evropy a odtud později do Ameriky, jižní Afriky a Austrálie (Boursot *et al.*, 1993; Guénet & Bonhomme, 2003).

Na hranicích areálů rozšíření dochází k sekundárnímu kontaktu jednotlivých poddruhů, které se mezi sebou kříží a produkují hybridní potomstvo, které je alespoň částečně fertillní. V Evropě se setkávají poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, kde vytvářejí dlouhou a úzkou hybridní zónu (obr. 6), která vede napříč Jutským poloostrovem a dále od pobřeží Baltského moře přes střední Evropu a Balkán až k Černému moři (Boursot *et al.*, 1993; Sage *et al.*, 1993; Macholán *et al.*, 2003). Část hybridní zóny zasahuje i do nejzápadnějšího výběžku České republiky, kde byl potvrzen výskyt jedinců obou poddruhů a jejich hybridů (Macholán & Zima, 1994; Lazarová, 1999; Munclinger *et al.*, 2002). Hybridní zóna myši patří k nejlépe prostudovaným (přehled v Boursot *et al.*, 1993; Sage *et al.*, 1993; pro nejnovější poznatky viz Macholán *et al.*, 2003; Payseur *et al.*, 2004; Britton-Davidian *et al.*, 2005; Dod *et al.*, 2005; Raufaste *et al.*, 2005; Teeter *et al.*, 2008), včetně české části (Macholán & Zima, 1994; Munclinger *et al.*, 2002; Bímová *et al.*, 2005; Macholán *et al.*, 2007a). Vzájemný kontakt mezi poddruhy se neomezuje jen na evropský kontinent – hybridní zóna mezi *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* byla popsána v Číně (Sage *et al.*, 1993) a v Japonsku, kde přirozeným křížením vznikla jedinečná populace nazývaná *M. m. molossinus* (Yonekawa *et al.*, 1988). Studium hybridních zón má značný význam při řešení otázky vzniku nových druhů, protože v těchto oblastech probíhá hybridizace po mnoho generací a navíc veškeré hybridní potomstvo podléhá přísnému přírodnímu výběru, který je obtížné simulovat v laboratorních podmínkách. Proto bývají hybridní zóny často označovány za „přírodní laboratoře“ (Hewitt, 1988) nebo „okna do evoluce“ (Harrison, 1990).

Právě existence poddruhů, hybridních zón, podrobných genetických map genomu a laboratorních kmenů (viz kap. 4) činí z myši domácí vhodného a užitečného kandidáta pro studium genetických základů sterility hybridů u savců.



Obr. 6: Geografické rozšíření tří druhů rodu *Mus*, *M. spretus*, *M. macedonicus* a *M. spicilegus* (čtvrtý druh, *M. cypriacus*, je znám pouze z Kypru) a znázornění kolonizačních cest domácích myší. Do Ameriky a Austrálie byla myš domácí zavlečena lidmi během osídlování nově objevených kontinentů. Převzato z Guénet & Bonhomme (2003).

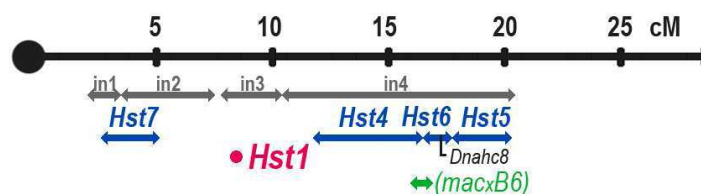
3.4 Sterilita hybridů u myši domácí

3.4.1 Lokus *Hst1*

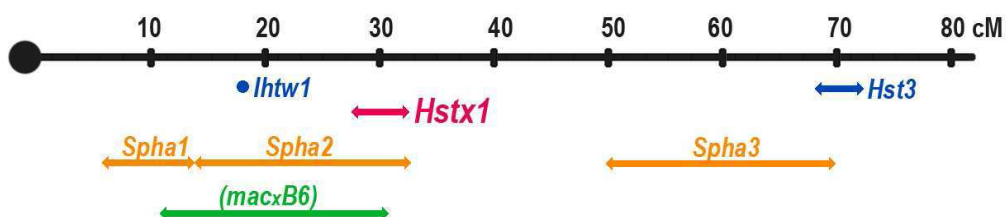
Sterilita hybridů byla u myši domácí poprvé popsána u hybridních samců mezi divokými myšmi *M. m. musculus* odchycenými v Praze a laboratorním kmenem C57BL/10 (B10), jehož převážná část genomu má původ v poddruhu *M. m. domesticus*. Jeden z lokusů, který se podílí na vzniku této sterility hybridů, byl zmapován pomocí polymorfismu neseném kmeny B10 a C3H (Iványi *et al.*, 1969; Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1996). Zároveň se jedná i o první lokus podmiňující sterilitu hybridů známý u savců. Pozorovaná sterilita hybridů se fenotypově projevila zastavením spermatogeneze u primárních spermatocytů v pachytenním stádiu (Forejt, 1981; Yoshiki *et al.*, 1993). Sterilní hybridní samci měli nižší hmotnost varlat, v *ductus epididymis* nebyly přítomny spermie, přesto měli (relativně k velikosti varlat) normální hladiny testosteronu v krvi (Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1985). Lokus zodpovědný za tento fenotyp byl nazván *Hybrid sterility 1 (Hst1)* a byl postupně zmapován do 255 kb

dlouhé oblasti v proximální části chromosomu 17 (obr. 7) (Forejt & Iványi, 1975; Forejt *et al.*, 1991; Trachtulec *et al.*, 1994, 1997, 2005, 2008; Gregorová *et al.*, 1996). Pomocí pozičního klonování byl pro *Hst1* nalezen ideální kandidát, kterým je gen *Prdm9* (*PR domain containing 9*), který je exprimován ve varlatech (Mihola *et al.*, v recenzním řízení). Tento gen, popsáný také jako *Meisetz*, se exprimuje v průběhu meiózy a kóduje specifickou histon H3 methyltransferázu, která katalyzuje trimethylaci histonu H3 dimethylovaného na lysinu 4 (Hayashi *et al.*, 2005; Hayashi & Matsui, 2006). Tato epigenetická modifikace histonu H3 je spojena s transkripční aktivací eukaryotických genů (Bernstein *et al.*, 2005). Gen *Prdm9* je tak schopný aktivovat specifické geny potřebné ke zdárnému průběhu meiózy (Hayashi & Matsui, 2006). *Knock-out* tohoto genu způsobuje u myši zástavu oogeneze a spermatogeneze ve stadiu primárních spermatocytů (Mihola *et al.*, v recenzním řízení).

Chromosom 17



Chromosom X



Obr. 7: Schematická mapa umístění lokusů podílejících se na sterilitě hybridů na chromosomu 17 a chromosomu X. Červeně jsou vyznačeny lokusy identifikované z křížení *M. m. muschulus* x B10, oranžově *M. m. molossinus* x B6, modře mezi *M. spretus* x B6 a zeleně *M. macedonicus* x B6. V proximální části chromosomu 17 může být přítomen *t*-haplotyp, na kterém se nachází čtyři paracentrické inverze (vyznačeny šedě). *T*-haplotyp je sobecký DNA element, který působí dysfunkci spermiím neobsahující tento haplotyp. Lokusy *Sha1*, *Sha2* a *Sha3* jsou v databázi Mouse Genome Database of The Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org) evidovány pod názvy *Spha1*, *Spha2* a *Spha3*.

Z křížení divokých myší *M. m. musculus* odchycených ve Studenci v České republice (vzdálen 250 km východně od centra hybridní zóny a 160 km od Prahy) s kmenem B10 jsme prokázali vliv proximální části chromosomu 17 na sterilitu hybridů a přítomnost polymorfismu pro tento znak i v jiné alopatrické populaci *M. m. musculus* (Vyskočilová *et al.*, 2005). Molekulárně genetická analýza ale odhalila neúplnou segregaci sterility hybridů s *Hst1* oblastí a poukázala na přítomnost dalších genů podmiňující sterilitu hybridů, které jsou pravděpodobně polymorfni v populaci divokých myší *M. m. musculus*.

3.4.2 Sterilita asociovaná s chromosomem X

Sterilita hybridů, která se projevuje sníženou hmotností varlat, sníženým počtem spermií a přítomností morfologicky poškozených hlaviček u spermií, byla pozorována i u hybridů s introgresí chromosomu X z inbredního kmene PWD (odvozen od *M. m. musculus*) na genetickém pozadí laboratorního kmene C57BL/6 (B6) (Storchová *et al.*, 2004). Genetická analýza odhalila, že sterilita má oligogenní základ zahrnující téměř celý chromosom. Nejsilnější účinek na sterilitu vykazoval gen v centrální části chromosomu X a byl nazván *Hstx1* (*X-linked hybrid sterility 1*) (obr. 7). Oblast nesoucí *Hstx1*, která byla genetickým mapováním zúžena na délku 4,5 Mbp, obsahuje 19 genů a u sedmi z nich byla prokázána exprese ve varlatech. Výše popsaný proces poruchy spermatogeneze byl nalezen i ve varlatech konsomických samců se substitucí chromosomu X, pocházejícího z divokých myší *M. m. molossinus*, na genetickém pozadí laboratorního kmene B6 (Oka *et al.*, 2004). Byly identifikovány tři lokusy ovlivňující morfologii hlaviček spermií: *Sha1* (*Sperm head anomaly 1*), *Sha2* a *Sha3*. Následně byly prokázány interakce mezi třemi lokusy na autosomech a chromosomem X, které mají vliv na abnormální tvary hlaviček (Oka *et al.*, 2007). Lokus *Ilx1* (*Interacting locus with the X chromosome 1*) se nachází na chromosomu 1. Lokus *Ilx2* byl lokalizován do distální, kdežto *Ilx3* do proxiální části chromosomu 11. *In vitro* fertilizace ukázala, že spermie s morfologicky poškozenou hlavičkou obtížně pronikají přes *zona pellucida* vajíčka. Vliv introgerese chromosomu X na sterilitu hybridů potvrzují i nejnovější studie hybridních samců vzniklých křížením inbredních linií odvozených z *M. m. musculus* (PWK) a *M. m. domesticus* (LEWES), které potvrdily přítomnost minimálně dvou lokusů na chromosomu X, které se významně podílí na vzniku sterility hybridů (Good *et al.*, 2008a).

Při recipročním křížení volně žijících myší *M. m. musculus* a B10 jsme pozorovali významné rozdíly ve fenotypovém projevu sterility a poukázali na možný vliv směru křížení na vznik sterility hybridů (Vyskočilová *et al.*, 2005). Vliv reciprocity křížení na projev

sterility hybridů potvrzují i další studie, zabývající se křížením inbredních linií odvozených z *M. m. musculus* (PWK, MDH, CZECHII) a *M. m. domesticus* (LEWES, DDO, WSB) (Britton-Bavidian *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2008a, b). Pouze ze zpětného křížení (PWK x LEWES) x LEWES vznikali neplodní hybridní samci se sníženou váhou varlat a nízkým počtem spermií. Ve zpětném křížení opačného typu (LEWES x PWK) x PWK tento jev nebyl pozorován (Good *et al.*, 2008a).

3.4.3 Další lokusy podmiňující sterilitu hybridů

Z křížení kongenních myší mající část svého genomu původem z *M. spretus* s myši kmene B6 bylo popsáno šest lokusů ovlivňujících plodnost (obr. 7). Čtyři lokusy, *Hst4* (Pilder *et al.*, 1991), *Hst5*, *Hst6* (Pilder *et al.*, 1993) a *Hst7* (Pilder, 1997), leží na proximálním konci chromosomu 17. V poslední době se ukazuje, že sterilita způsobovaná lokusem *Hst6* je velice komplexní a účastní se jí pravděpodobně nejméně tři geny v *Hst6* oblasti. Pro proximální *Hst6* byl nalezen vhodný kandidátní gen, kterým je gen pro axonemální dynein, *Dnahc8* (Samant *et al.*, 1999, 2005; Fosella *et al.*, 2000). Další dva lokusy se nacházející na chromosomu X, jeden v distální části, *Hst3* (Guénet *et al.*, 1990) a druhý v proximální části, *Ihtw1* (*Interspecific hybrid testis weight 1*), který ovlivňuje hmotnost varlat (Elliott *et al.*, 2001). Ačkoliv u hybridních samců nebyly nalezeny zralé spermie, v semenotvorných kanálcích byla pozorována přítomnost spermatocytů, některé ve stadiu metafáze 1. meiotického dělení. Tento jev může být důsledkem špatného párování chromosomů X a Y, způsobené heterozygotností v pseudoautosomové oblasti (Forejt & Ivanyi, 1975; Mastuda *et al.*, 1992) nebo poruchou tvorby XY tělíska.

Ze zpětného křížení samic (*M. macedonicus* x B6)_{F1} se samci B10 byly identifikovány dva lokusy odpovědné za sterilitu hybridů, které se nachází v proximální části chromosomu 17 a X (Elliot *et al.*, 2004; obr. 7). Cytologická analýza varlat potvrdila přítomnost poruch párování chromosomu X a Y v metafázi 1. meiotického dělení.

Druhy *M. spretus*, *M. macedonicus* a *M. musculus* jsou úplně reprodukčně izolované a v přírodě nedochází k jejich mezidruhovému křížení. Je proto možné, že inkompatibility mezi *M. spretus* a B6 (*M. m. domesticus*) a mezi *M. macedonicus* a B6 (*M. m. domesticus*) jsou spíše jen druhotným následkem divergence než samotnou příčinou speciace.

4 INBREDNÍ KMENY MYŠÍ A JEJICH VYUŽITÍ

4.1 „Klasické“ inbrední kmeny

Laboratorní myš představuje významný savčí modelový organismus. Jednou z výhod je dostupnost standardních laboratorních kmenů. V případě, že použijeme stejné inbrední kmeny, můžeme eliminovat genetickou variabilitu jako případný zdroj nesrovnalostí při porovnávání výsledků získaných z různých experimentů, laboratoří či časových úseků.

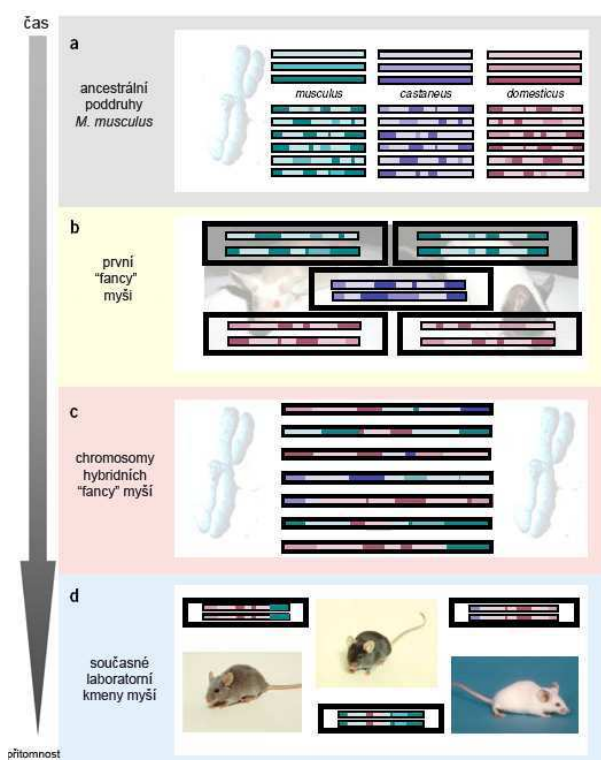
Inbrední kmen vzniká záměrným příbuzenským křížením. Procesem páření bratr-sestra v každé následující generaci dochází ke ztrátě heterozygotnosti čili k fixaci pouze jedné alely na všech lokusech (Silver, 1995). Po více jak dvaceti generacích by všichni potomci měli mít genom z 98,7% homozygotní. Po čtyřiceti generacích pak všechny lokusy budou z 99,98% homozygotní. Tento proces, nazývaný příbuzenské křížení (inbreeding), produkuje inbrední myši, které jsou geneticky homogenní a homozygotní ve všech lokusech. Snížení obrovské genetické variability, kterou nacházíme v přírodě, nám umožňuje lépe postihnout vztahy mezi fenotypem a genotypem. Inbrední kmeny jsou pak velmi užitečným nástrojem pro genetické mapování, kdy se zjišťuje, které části genomu jsou odpovědné za studovaný fenotyp.

V současné době je známo a používáno více než 450 laboratorních kmenů a jejich variant (Festing, 1996; Beck *et al.*, 2000). Původní laboratorní kmeny byly odvozeny z volně žijících populací myši domácí (*Mus musculus*) pocházejících převážně z Evropy a Asie, které prošly spletítm vývojem (obr. 8).

Studie nejstarších, tzv. „klasických“, inbredních kmenů prováděné v 80. letech 20. století ukázaly, že tyto kmeny sice obsahují mitochondriální DNA typickou pro západoevropský poddruh *M. m. domesticus*, ale struktura jejich chromosomu Y u mnoha z nich spíše odpovídala východnímu poddruhu *M. m. musculus* (Ferris *et al.*, 1982; Bishop *et al.*, 1985; Blank *et al.*, 1986; Bonhomme *et al.*, 1987; Nishioka, 1987). Později bylo zjištěno, že chromosom Y byl zřejmě do inbredních kmenů introdukován křížením *M. m. domesticus* přivezených do Spojených států ze západní Evropy s jedinci pocházejícími z Dálného východu, především z Japonska a Číny (Nagamine *et al.*, 1992). Jak bylo zmíněné v předchozí kapitole, japonské populace byly popsány jako samostatný poddruh *M. m. molossinus*, později se však ukázalo, že tento taxon je ve skutečnosti hybridní formou vzniklou přirozeným křížením *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* z jihovýchodní Asie. Japonské a čínské myši byly po staletí chovány pro zábavu a šlechtěny do rozličných

barevných variet a proto často dováženy do Evropy i Ameriky jako domácí mazlíčci (Berry 1981; Beck *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2002).

Struktura genomu „klasických“ inbredních kmenů byla dále podrobněji studována pomocí oblastí obsahující tzv. jednonukleotidový polymorfismus (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) podmíněný záměnou (mutací) jediné báze v řetězci DNA. Následující detailní analýzy odhalily, že 65-92% genomu těchto kmenů je odvozeno od *M. m. domesticus* (Wade *et al.*, 2002, Frazer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Mezi nejznámější a nejpoužívanější kmeny patří např. C57BL/6J, A/J, C3H/HeJ a DBA/2J (Wade & Daly, 2005).



Obr. 8: Odvození původu laboratorních myši. (a) Poddruhy *M. musculus* jako *musculus* (zelená), *castaneus* (modrá) a *domesticus* (červená) jsou samy o sobě mozaikou chromosomů jejich předků, kteří tvořili samostatné fylogenetické skupiny. Barvy reprezentují rozdílné poddruhy, různé odstíny barev pak různé varianty chromosomů příslušného poddruhu. (b) Díky oblíbě chovu „fancy“ myši se mohly setkat poddruhy myši z Asie (*musculus*, *castaneus* a *molossinus*) a západní Evropy (*domesticus*). (c) Tyto myši s různým původem byly křížením šlechtěny do rozličných barevných variet a typů chování. (d) Na počátku 20. století byli potomci „fancy“ myši úmyslně použiti jako zakladatelé inbredních laboratorních kmenů, které se používají dodnes. Tyto myši nesou segmenty genomu pocházejících jak z různých poddruhů *M. musculus*, tak z odlišných chromosomů příslušného poddruhu. Převzato z Wade & Daly (2005).

4.2 „Čisté“ inbrední kmeny

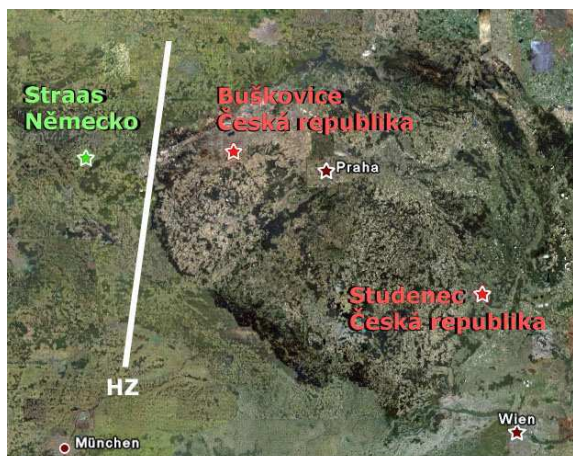
Přestože mají „klasické“ laboratorní kmeny klíčovou roli při zkoumání řady biologických procesů (Davisson & Linder, 2004) a jsou nezastupitelným modelem v biomedicině (Festing, 1996; Fox *et al.*, 2007), pro mapování speciálních genů nejsou příliš vhodné. Introgresí vzniklý hybridní genom „klasických“ laboratorních kmenů byl formován epistatickou selekcí proti D-M inkompatibilitám a člověkem ovlivněnou selekcí jedinců v laboratorním chovu (Payseur & Hoekstra, 2005; Wade & Daly, 2005). Jejich mozaikovitá struktura genomu, s obtížně zjistitelným původem jednotlivých částí chromosomů, která se nadto nenachází volně v přírodě, se tak stává nesnadnou překážkou nejen při studiu

mechanismů speciace (Silver, 1995; Beck *et al.*, 2000; Wade *et al.*, 2002; Payseur & Hoekstra, 2005).

Jedním z předpokladů pro přesnější studium speciálních mechanismů na genové úrovni je tedy vytvoření „čistých“ inbredních kmenů odvozených přímo z volně žijících myší (tzv. „wild-derived inbred strains“), tzn. kmenů, které mají jasně definovaný a zdokumentovaný původ (pojem „čistý“ je zde používán jako *terminus technicus* poukazující na rozdíl od „klasických“ kmenů s mozaikovým genomem). Vzhledem k tomu, že „klasické“ kmeny vznikly z omezeného množství předků, mají značně sníženou míru genetické variability (Bonhomme *et al.*, 1987). Proto se začaly hledat zdroje nové variability a volně žijící populace jsou jejím přirozeným potenciálním zdrojem.

K nejčastěji používaným „čistým“ inbredním kmenům patří CAST/Ei (*M. m. castaneus*), SPRET/Ei (*M. spretus*), CZECHII/Ei, PWK/Ph a PWD/Ph (*M. m. musculus*), WSB/Ei a PERA/Ei (*M. m. domesticus*) (Wade & Daly, 2005). Tyto kmeny jsou široce využívány k identifikaci a studiu genetických inkompatibilit vedoucích k reprodukční izolaci (Britton-Davidian *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2004, 2006; Storchová *et al.*, 2004; Payseur & Hoekstra, 2005; Payseur & Place, 2007; Good *et al.*, 2008a, b; Trachtulec *et al.*, 2008). Avšak kromě kmenů PWK a PWD, odvozených z volně žijících populací *M. m. musculus*, které při křížení s linií B10 dávají sterilní samčí potomstvo (Forejt & Iványi, 1975; Gregorová & Forejt, 2000), nebyly doposud cíleně vytvořeny inbrední linie odvozené od volně žijících myší *M. m. musculus* nebo *M. m. domesticus* s vhodně zvoleným a otestovaným fenotypovým projevem, které by umožnily podrobnější studium genetického pozadí nejen sterility hybridů, ale i dalších možných reprodukčně izolačních mechanismů.

Za účelem studia mechanismu vzniku reprodukčních bariér jsme od roku 2001 započali s přípravou „čistých“ inbredních kmenů s přesně definovaným geografickým původem a odlišnými studovanými fenotypy. Celkem jsme vytvořili osm nových linií myší odvozených od divokých populací obou druhů, 3 linie odvozené od *M. m. domesticus* a 5 linií odvozených od *M. m. musculus* (Piálek *et al.*, 2008). Všechny tři linie odvozené od *M. m. domesticus* pocházejí z volně žijících myší odchycených v lokalitě, která se nachází západně od okraje hybridní zóny (Straas, Německo). Dvě linie odvozené od *M. m. musculus* mají původ v myších odchycených na východ od okraje hybridní zóny (Buškovice, Česká republika) a zakladatelské páry myší tří „*musculoidních*“ linií pocházejí z lokality, která se nachází 250 km východně od centra hybridní zóny (Studeneč, Česká republika) (obr. 9). Tyto linie byly testovány na přítomnost polymorfismu u 485 mikrosatelitových markerů (http://www.studenec.ivb.cz/projects/inbred_strains/genetic_data.php), 296 z nich bylo



Obr. 9: Mapa lokalit, kde byl prováděn odchyt divokých myší domácích použitých pro vytvoření osmi „čistých“ inbredních linií (Piálek *et al.*, 2008). Červenou hvězdou jsou vyznačeny populace *M. m. musculus*, zelené hvězda označuje populace *M. m. domesticus*. Bílá čára naznačuje, kudy prochází střed hybridní zóny (HZ). Mapa převzata z Google Earth.

druhově specifických buď pro *musculus* nebo *domesticus* a představují tak vhodné markery pro případné genetické mapování (Piálek *et al.*, 2008).

Pro studium genetického pozadí sterility hybridů byly vytvořeny kmeny myší STUS (Studenec Sterile) a STUF (Studenec Fertile) odvozené od *M. m. musculus* a ve kterých se již zafixovaly alely s odlišným fenotypovým projevem (sterilní nebo fertilní hybridní samci) při křížení s „klasickým“ laboratorním kmenem B10 (Piálek *et al.*, 2008, Vyskočilová *et al.*, odesláno). Tyto kmeny byly odvozeny od rodičovského páru divokých myší, které byly již dříve fenotypově i genotypově otestovány na výskyt sterility hybridů z křížení s kmenem B10 a tento experiment ukázal, že sterilitu hybridů ovlivňuje nejen lokus *Hst1*, ale naznačil i možnost existence dalších genů odpovědných za sterilitu hybridů (Vyskočilová *et al.*, 2005). U dalších linií, které byly odvozeny od myší z lokalit nacházejících se co nejbližší k hybridní zóně, ale dostatečně vzdálené, aby zůstal původ genomu geneticky čistý, byly popsány a charakterizovány významné rozdíly v morfologii, reprodukční zdatnosti, *in vitro* imunitní odpovědi, agresivitě a preferenci partnera na základě močových signálů, které mohou hrát důležitou roli v rozpoznávání příslušníků vlastního poddruhu a podílet se na vytváření účinných prezygotických reprodukčních bariér (Piálek *et al.*, 2008; Bímová *et al.*, v tisku).

5 MAPOVÁNÍ QTL ODPOVĚDNÝCH ZA STERILITU HYBRIDŮ

5.1 Mapování QTL

Studium genetické struktury reprodukčních vlastností a objevování genů podílejících se na jejich projevu, tedy možných kandidátů na speciální geny, je neustále v centru zájmu evolučních biologů. U zkoumaných organismů se k identifikaci lokusů způsobujících studovaný fenotyp nejčastěji používají klasické vazebné analýzy, cílená mutační analýza genů a nebo analýza lokusů pro kvantitativní znaky (Glazier *et al.*, 2002; Threadgill *et al.*, 2002). Reprodukční zdatnost je výsledkem působení mnoha genetických faktorů, které mají velmi často polygenní základ a jsou ovlivněny mnohými genetickými interakcemi. Mapování lokusů pro kvantitativní znaky nám umožňuje jednotlivé polygenní efekty rozpoznat a lokalizovat.

Jako lokusy kvantitativních znaků (QTL, „Quantitative Trait Loci“) se označují geny (častěji jde o větší či menší oblasti na chromosomu, které tyto geny obsahují), které spolu s ostatními geny významně ovlivňují projev kvantitativních fenotypových znaků. Analýza těchto lokusů (analýza QTL, mapování QTL) je založena na nalezení korelace mezi genotypem, reprezentovaným vhodným molekulárním markerem, a studovaným fenotypovým znakem (Soller & Brody, 1976). Marker sám nemusí ležet ve funkčním genu, musí však být polymorfní a snadno rozpoznatelný molekulárními laboratorními technikami. Mezi nejčastěji využívané DNA markery patří vysoce variabilní mikrosatelity (viz kap. 5.2) a SNP (Dietrich *et al.*, 1996; Iakoubova *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2000; Threadgill *et al.*, 2002; Petkov *et al.*, 2004; Frazer *et al.*, 2007). Nalezení možného vztahu mezi daným markerem a fenotypem je prováděno pomocí různých statistických metod a zahrnuje několik kroků (Silver, 1995; Darvasi, 1998; Broman, 2001; Manly *et al.*, 2001): detekce možných QTL (t-test, ANOVA, lineární regrese, intervalové mapování), upřesnění lokalizace možných QTL (jednoduché intervalové mapování („Simple Interval Mapping“)), stanovení hladin statistické významnosti pravděpodobnosti pro možné QTL (permutační test) a ověření účinku kombinací možných QTL (složené intervalové mapování („Composite Interval Mapping“)), mapování více znaků („Multiple Trait Mapping“). Korelaci mezi markerem a QTL je možno stanovit za předpokladu, že je narušena rovnováha vazeb mezi lokusy. Narušení této rovnováhy lze dosáhnout např. křížením inbredních linií a tvorbou F₂ generací nebo generací zpětného křížení.

Při genetické analýze kvantitativních znaků u savců se však objevují praktické i teoretické problémy. Za prvé, genom obsahuje asi 5 miliard nukleotidů a desetitisíce genů, čímž se prodražují veškeré celogenomové srovnávací analýzy (Tsuchihashi & Dracopoli, 2002). Za druhé, počet jedinců, které můžeme do genetické analýzy zahrnout a stanovit jejich fenotyp, je omezený. U zvířat je to dáno limitujícími možnostmi chovu a křížení. U lidí je situace ještě mnohem složitější a často se vychází z dat získaných pouze od několika rodin. A za třetí, tradiční statistické metody byly primárně zaměřeny na identifikaci jednotlivých efektů spíše než analýzu složek komplexního znaku (Mackay, 2001). V lidské populaci tak přítomnost genetické a environmentální heterogenity a nedostatek vhodných modelů pro studium jejich vzájemných interakcí představují hlavní překážku při hledání genetických příčin komplexních fenotypů (Cordell, 2002). Z tohoto pohledu představuje myš domácí, resp. různé laboratorní kmeny myši domácí, ideální savčí modelový organismus pro analýzu kvantitativních znaků. Kromě relativně ekonomické nenáročnosti chovu, krátkého životního cyklu a většího počtu potomstva v jednom vrhu (Silver, 1995), je velkou výhodou znalost jejího genomu a existence řady podrobných genetických map (Beck *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2002; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002; Guénet, 2005; Wade & Daly, 2005; Yang *et al.*, 2007) bezplatně přístupných na internetu, např. v databázích Mouse Genome Database of The Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org), Whitehead Institute (www.ensembl.org), UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>), NCBI - Mouse Genome Resources (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/) a mnohých dalších. V uvedených databázích lze nalézt mapy obsahující miliony SNP (Wade & Daly, 2005; Frazer *et al.*, 2007) a tisíce mikrosatelitových markerů, často sestavených do vhodných testovacích sestav pokrývajících celý genom (Dietrich *et al.*, 1996; Iakoubova *et al.*, 2000; Gregorová & Forejt, 2000; Piálek *et al.*, 2008 a mnoho dalších). V současné době také existuje celá řada volně dostupných počítačových programů, které slouží k mapování QTL (QTL Cartographer, Mapmaker/QTL, Map Manager QTX, MultiQTL, PLABQTL, QGene, atd) a neustále se rozvíjejí nové přístupy hodnocení získaných dat, umožňující přesnější analýzu komplexních znaků (Schliekelman, 2008).

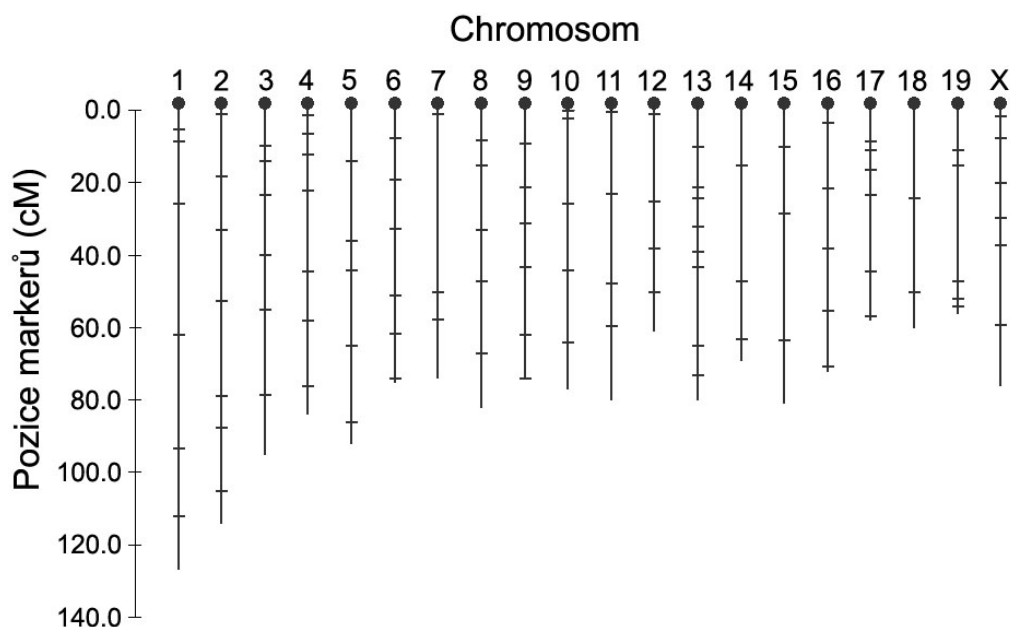
5.2 Experimentální křížení inbredních linií a analýza dat

Pro genetické mapování jednotlivých fenotypových znaků podílející se na plodnosti hybridů jsme použili „čisté“ linie STUS a STUF, které byly odvozeny od *M. m. musculus* a z křížení těchto linií s inbredním kmenem B10 vzniká hybridní sterilní nebo fertlní samčí

potomstvo (Piálek *et al.*, 2008; Vyskočilová *et al.*, odesláno). Vzhledem k tomu, že tyto „*musculoidní*“ linie mají zafixované odlišné fenotypy, představují vhodný a efektivní nástroj pro mapování genů (lokusů) ovlivňující fertilitu hybridů.

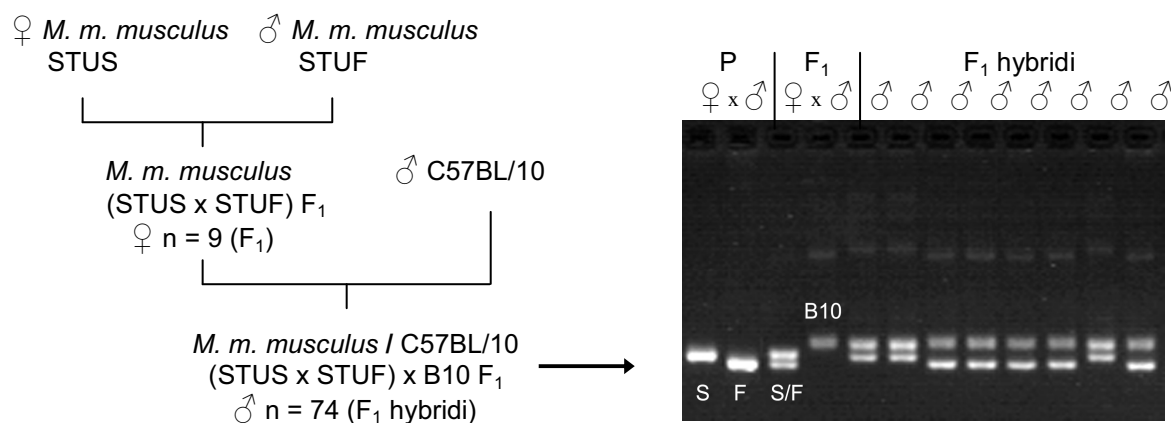
Jako vhodné markery pro QTL mapování byly vybrány mikrosatelity. Mikrosatelity, nebo také VNTR („Variable Number of Tandem Repetitions“) nebo SSR („Simple Sequence Repeats“) či SSLP („Simple Sequence Length Polymorphisms“), jsou tandemové repetice s krátkým nukleotidovým motivem, nejčastěji di- nebo trinukleotidovým (např. (AT)_n, (ATG)_n) a vyskytují se v genomu většiny eukaryot (Love *et al.*, 1990; Goldstein & Schlötterer, 1999). Velikou předností mikrosatelitů jako DNA markerů je jejich vysoká početnost a, až na několik výjimek, jejich rovnoměrné rozložení v jaderném genomu myši (Love *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1996). Další výhodou je vysoká úroveň polymorfismu a kodominantní dědičnost. Jednotlivé alely, které se liší různým počtem opakování a tedy i různou délkou repetice, vznikají se značně vysokou frekvencí. Mutační rychlost mikrosatelitů u myši byla odhadnuta na 10^{-3} až 10^{-4} na lokus a generaci (Dallas, 1992). Nezanedbatelnými klady mikrosatelitů jsou také snadná dostupnost již známých sekvencí a případně primerů pro PCR, následná technicky, finančně i časově nenáročná detekce a vysoká reprodukovatelnost dosažených výsledků (Silver, 1995; Dietrich *et al.*, 1996; Goldstein & Schlötterer, 1999).

Před vlastní analýzou QTL sterility hybridů bylo nejprve nutno rozlišit velikostně rozdílné alely, které jsou specifické pro použité inbrední linie (STUS, STUF a B10), a sestavit vhodný



Obr. 10: Rozložení mikrosatelitových markerů na jednotlivých chromosomech použitých k mapování sterility samců z křížení mezi liniemi STUS, STUF a B10. Chromosom je naznačen černou čarou, centromera kolečkem. Pozice markeru na chromosomu byla převzata z internetové databáze Mouse Genome Informatics of The Jackson Laboratory (<http://www.informatics.jax.org/>).

panel polymorfních mikrosatelitových markerů pokrývajících jednotlivé chromosomy (Piálek *et al.*, 2008; Vyskočilová *et al.*, odesláno; obr. 10). Pro zachycení možných QTL při celogenomovém mapování by měly markery pokrývat chromosom v průměrné vzdálenosti přibližně 10-15 cM (Silver, 1995). Hybridní samci, u kterých se zjišťovala hmotnost varlat, hmotnost nadvarlete, průměrný počet spermií a byla provedena histologické analýza řezů varlaty, byli připraveni křížením (STUS x STUF)_{F1} s B10 (obr. 11). Pro rozeznání původu lokusu na chromosomu byla sledována přítomnost alely specifické pro linii STUS nebo STUF a pomocí PCR a následné elektroforetické separace PCR produktu na agarózovém gelu byly stanoveny genotypy u všech vyšetřovaných hybridních samců (obr. 11). Získaná data byla vložena do softwaru MapManager QTX, verze b20 (Manly *et al.*, 2001), který pak určil relativní vzdálenosti mezi mapovanými markery, stanovil pořadí použitých markerů na každém chromosomu a pomocí intervalového mapování a ANOVA vypočítal hodnotu LRS („Likelihood Ratio Statistic“), která je měřítkem statistické průkaznosti potenciálních QTL. Pro výpočet genetické vzdálenosti byla použita Kosambiho funkce, která počítá s určitým stupeň interference a je obecně z mapovacích funkcí považována za přesnější pro většinu vyšších organismů. Stejný software byl použit ke stanovení podílu genetické variance daného fenotypu, který může být vysvětlen detekovanými QTL, a k analýze interakcí mezi možnými QTL.



Obr. 11: Schéma experimentálního křížení linií a ukázka analýzy genotypů hybridních samců pomocí polymorfních mikrosatelitových lokusů. Odlišný původ alel daného markeru je v tomto případě detekován metodou PCR a agarózovou elektroforézou na základě rozdílné velikosti PCR produktů. Linie STUS je nositelem alely *S* (první dráha), linie STUF alely *F* (druhá dráha atd.), potomek vzniklý zkřížením těchto linií (F₁) musí mít obě alely (*S/F*). Inbrední kmen C57BL/10 nese alelu *B10*. U hybridních samců *M. m. musculus*/B10 (F₁ hybridů) je pak sledována přítomnost alely *S* nebo *F* ukazující na původ daného lokusu na chromosomu, druhá alela je vždy původem z inbredního kmene B10.

5.3 Mapování QTL sterility hybridů u *Mus musculus*

Během prvotního experimentu, kdy se křížily divoké myši *M. m. musculus* s kmenem B10, jsme potvrdili výskyt sterility hybridů. Část z (*M. m. musculus* x B10) F₁ samců byla úplně sterilní, s významně sníženou hmotností varlat a nadvarlete s absencí spermií (Vyskočilová *et al.*, 2005). Sterilita postihovala pouze samce, ve shodě s Haldaneovým pravidlem. Tento typ sterility jsme zaznamenali i zhruba u třetiny (STUS/STUF x B10) F₁ hybridních samců ze zpětného křížení (Vyskočilová *et al.*, odesláno). Histologická analýza řezů varlaty sterilních samců ukázala, že atrofované semenotvorné kanálky obsahují pouze Sertoliho buňky, spermatogonie a primární spermatocyty, u kterých dochází k zástavě spermatogeneze v průběhu pachytenní fáze. Tento jev byl již dříve pozorován u hybridních samců z křížení „čistých“ *musculoidních* kmenů s „klasickým“ laboratorním kmenem C57BL/10 (Forejt & Iványi; 1975, Forejt, 1996) nebo BALB/c (Yoshiki *et al.*, 1993) a hlavní faktor způsobující zástavu spermatogeneze byl zmapován do proximální části chromosomu 17. Poruchy meiotického dělení v pachytenní fázi byly pozorovány také u F₁ hybridů mezi divokými myšmi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, bohužel nebylo v tomto případě provedeno genetické mapování pro identifikaci možných QTL (Britton-Bavadian *et al.*, 2005).

Přibližně 20% hybridních samců byli jedinci, kteří trpěli nižší hmotností varlat a nadvarlete a zároveň nízkým počtem spermií (Vyskočilová *et al.*, odesláno). Tato skupina samců vykazovala, kromě zmíněné zástavy spermatogeneze v pachytenní fázi, známky spermioenního defektu (Bolor *et al.*, 2005, 2006), kdy v semenotvorných kanálcích byly v malém množství přítomny spermatidy s vadným vývojem akrosomu. Elongované spermatidy byly zaznamenány jen velmi zřídka a pouze s defektním akrosomem. Tento proces poruchy spermatogeneze byl popsán i ve varlatech konsomických samců s introgresí chromosomu X pocházejícího z divokých myší *M. m. musculus* (Storchová *et al.*, 2004) nebo z *M. m. molossinus* (Oka *et al.*, 2004, 2007) na genetickém pozadí laboratorního kmene B6 a také u hybridních samců vzniklých křížením „čistých“ inbredních linií *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Britton-Bavadian *et al.*, 2005; Good *et al.*, 2008a, b). Většina spermií takto postižených samců měla morfologicky poškozené hlavičky. Hlavní genetický faktor odpovědný za abnormální tvary hlaviček spermií byl mapován do centrální a distální části chromosomu X (Storchová *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2004, 2007; Good *et al.*, 2008a, b).

Genetická analýza sterility (STUS/STUF x B10) F₁ hybridních samců ukázala, že námi studovaná sterilita má složitější oligogenní základ a potvrdila tento předpoklad očekávaný na základě analýzy fenotypu. Nejsilnější a vysoce signifikantní účinek ($p < 0,001$) pro všechny sledované znaky spojené s fertilitou (hmotnost varlat, hmotnost nadvarlat a počet spermií)

vykazoval DNA marker v proximální části chromosomu 17 (Vyskočilová *et al.*, odesláno), který se nachází v blízkosti lokusu *Hst1* (Vyskočilová *et al.*, 2005). Lokus *Hst1* byl zmapován pomocí zpětného křížení ((B10 x C3H) x B10), jehož potomci byli testováni na přítomnost odlišných alel genu *Hst1* pomocí *M. m. musculus* (Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1996). Tímto způsobem byl identifikován polymorfismus v oblasti *Hst1* mezi „klasickými“ inbredními kmeny, převážně odvozenými od *M. m. domesticus*. Přestože mají inbrední linie B10 a C3H mozaikovitou strukturu genomu (Wade *et al.*, 2002; Wade & Daly, 2005), bylo na základě analýzy druhově specifických SNP potvrzeno, že původ 250 kb oblasti na chromosomu 17 obsahující lokus *Hst1* je u všech zkoumaných „klasických“ laboratorních kmenů odvozen od *M. m. domesticus* (Trachtulec *et al.*, 2008). Nalezli jsme a zafixovali genetické rozdíly v *Hst1* oblasti mezi dvěma liniemi *M. m. musculus* a zdokumentovali polymorfismus sterility asociované s lokusem *Hst1* v genomu *M. m. musculus* (Vyskočilová *et al.*, odesláno). Je možné, že se jedná o stejný gen jako pro lokus *Hst1*, ale pro úplné potvrzení jsou nezbytné další experimenty (Vyskočilová *et al.*, 2005, Vyskočilová *et al.*, odesláno).

Kromě nejsilnějšího QTL v proximální části chromosomu 17, jsme detekovali signifikantní účinek centrální části chromosomu X na hmotnost varlat a počet spermií. Možný QTL pro hmotnost nadvarlete jsme zaznamenali v distální části chromosomu 3. Kritická oblast v centrální části chromosomu X se překrývá s oblastí, v níž se nachází lokus *Hstx1*, který je zodpovědný za sníženou hmotnost varlat a abnormální tvary hlaviček u spermií (Storchová *et al.*, 2004). Předpokládaný význam chromosomu X pro sterilitu hybridů podporují i poznatky získané studium populací volně žijících myší *M. musculus* v hybridní zóně. Podrobnější analýzy, které se zabývají přechodem jednotlivých částí chromosomu X přes hybridní zónu, odhalily oblast v centrální části chromosomu X s výrazně sníženou introgrésí (Payseur & Nachman, 2005; Dufková *et al.*, připravováno do tisku). Tato oblast se překrývá s lokusy odpovědnými za sterilitu hybridů.

Námi provedená analýza epistatických interakcí mezi jednotlivými QTL pro sledované znaky spojené s fertilitou odhalila nejsilnější interakce mezi proximální částí chromosomu 17 a centrální částí chromosomu X. Jeví se, že linie STUS a STUF mají zafixovány D-M inkompatibility pro sterilitu hybridů projevující se v různém stádiu spermatogeneze. Data naznačují, že spermioenní defekt se pravděpodobně projeví pouze v případě, kdy došlo k potlačení sterility způsobené zástavou meiózy.

6 ZÁVĚR

Sterilita hybridů patří mezi postzygotické reprodukční bariéry, které v raném stádiu speciace zabraňují toku genetické informace mezi divergujícími populacemi. Její vznik je často podmíněn epistaticky vyvolanou inkompatibilitou mezi alespoň dvěma geny (D-M inkompatibilita). Z přírodních populací je však známo pouze několik studií, které se zaměřují na zkoumání polymorfismu možných D-M inkompatibilit odpovídajících za vznik sterility hybridů.

Jedním z nejvhodnějších savčích modelových organismů pro studium postzygotických bariér je myš domácí (*Mus musculus*). Jedná se o komplex forem, které nejsou ještě zcela reprodukčně izolovány a jednotlivé formy jsou klasifikovány jako poddruhy. Dva podruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se setkávají a tvoří dlouhou hybridní zónu, která prochází celou Evropou. Výsledky křížení inbredních kmenů odvozených z obou genomů myši potvrzují narušení spermatogeneze samců a tím naznačují, že by se sterilita hybridů mohla podílet na speciaci mezi oběma poddruhy myši.

Pro studium sterility hybridů byly použity volně žijící myši *M. m. musculus*, nově vytvořené linie STUS a STUF odvozené od *M. m. musculus* a laboratorní inbrední kmen C57BL/10 (B10), jehož převážná část genomu má původ v *M. m. domesticus*. V prvním experimentu, kdy se křížily divoké myši *M. m. musculus* s kmenem B10, byl potvrzen výskyt sterility v hybridním potomstvu. Sterilita postihovala pouze samce, ve shodě s Haldaneovým pravidlem.

Genetická analýza sterility (STUS/STUF x B10) F₁ hybridních samců ukázala, že námi studovaná sterilita má složitější oligogenní základ. Nejsilnější a vysoce signifikantní účinek pro všechny sledované znaky spojené s fertilitou (hmotnost varlat, hmotnost nadvarlat a počet spermií) vykazoval lokus v proximální části chromosomu 17, který se nachází v blízkosti *Hst1* (*Hybrid sterility 1*) lokusu. Lokus *Hst1* byl popsán pomocí polymorfismu mezi laboratorními inbredními kmeny B10 a C3H, převážně odvozenými od *M. m. domesticus*. Je to poprvé, kdy byly nalezeny genetické rozdíly v *Hst1* oblasti mezi dvěma liniemi *M. m. musculus* a zdokumentován polymorfismus sterility asociovaný s lokusem *Hst1* v genomu *M. m. musculus*. Pro potvrzení identity lokusů polymorfních v obou poddruzích jsou ale nezbytné další experimenty. Zdá se však, že genové nekompatibility asociované se samčí sterilitou se vyvíjely na chromosomu 17 nezávisle v genomu *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*.

Dále byl pozorován vliv chromosomu X na sterilitu hybridů. Centrální část chromosomu X vykazovala signifikantní účinek na hmotnost varlat a počet spermií. Tato kritická oblast se

překrývá s oblastí, v níž se nachází lokus *Hstx1* (*X-linked hybrid sterility 1*), který je zodpovědný za sníženou hmotností varlat a abnormální tvary hlaviček u spermií. Oba lokusy se zároveň nacházejí v části chromosomu X, u které byla nalezena výrazně snížená introgrese přes hybridní zónu.

Histologická analýza řezů varlaty ukázala, že k zástavě spermatogeneze dochází v pachytenní/zygotenní fázi a u části hybridních samců byly pozorovány známky spermiogenního defektu. Fertilní hybridní samci měli normální průběh spermatogeneze. Data naznačují, že sterilita způsobená zastavením spermatogeneze v pachytenní fázi je asociovaná s lokusem/lokusy na chromosomu 17, zatímco lokus/lokusy v centrální části chromosomu X by mohly být zodpovědné za spermiogenní defekt. Porucha spermiogeneze se pak projeví pouze v případech, kdy nedošlo k zástavě meiozy. Tento předpoklad podporuje i provedená analýza epistatických interakcí mezi jednotlivými QTL pro sledované znaky spojené s fertilitou, která odhalila nejsilnější interakce mezi proximální částí chromosomu 17 a centrální částí chromosomu X. Zajímavou perspektivou studia by mohla být detailnější analýza chromosomu 17 a X s využitím například pozičního klonování pro identifikaci genu *Hst1^w* a mutací podmiňujících sterilitu hybridů v genomu inbredních kmenů STUS a STUF, které mají zafixovaný alternativní fenotyp pro oba typy sterility.

Přes všechny dosavadní poznatky neexistuje v současné době v literatuře záznam o přítomnosti sterility hybridů ovlivněné lokusem *Hst1* nebo lokusy na chromosomu X z křížení volně žijících myší podruhu *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* v hybridní zóně. Ve shodě s údaji o samcích z hybridní zóny v Dánsku publikovaných Britton-Davidian (2005) jsme v česko-bavorském transektu pozorovali sníženou hmotnost varlat u hybridních samců pocházející z centra hybridní zóny (J. Piálek *at al.*, nepublikovaná data). Je možné, že D-M inkompatibility se mohou vyvíjet recentně a nezávisle v alopatrických populacích a postupně se šířit k hybridní zóně, a na její dynamiku zatím nemají podstatný vliv. K otestování tohoto předpokladu jsme započali s experimentálními kříženími zahrnující nově odvozené linie STUS a STUF s volně žijícími myšmi *M. m. domesticus* ke zdokumentování geografické proměnlivosti genů v divokých populacích *M. m. domesticus*.

7 PUBLIKACE TVOŘÍCÍ DISERTAČNÍ PRÁCI

Článek A

Vyskočilová, M., Trachtulec, Z., Forejt, J. & Piálek, J. 2005. Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 663-674.

Článek B

Piálek, J., Vyskočilová, M., Bímová, B., Havelková, D., Piálková, J., Dufková, P., Bencová, V., Ďureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H. C., Macholán, M., Munclinger, P., Storchová, R., Zajícová, A., Holáň, V., Gregorová, S. & Forejt, J. 2008. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *Journal of Heredity* 99: 34-44.

Článek C

Vyskočilová, M., Pražanová, G. & Piálek, J. Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17 (posláno do *Mammalian Genome*).

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Auffray, J.-C., Marshall, J.T., Thales, L. & Bonhomme F.** 1990. Focus on the nomenclature of European species of *Mus*. *Mouse Genome* **88**: 7-8.
- Auffray, J.-C., Orth, A., Catalan, J., Gonzalez, J.-P., Desmarais, E. & Bonhomme F.** 2003. Phylogenetic position and description of a new species of subgenus *Mus* (Rodentia, Mammalia) from Thailand. *Zool. Scripta* **32**: 119-127.
- Baker, R.J. & Bickham, J.W.** 1986. Speciation by monobrachial centric fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8245-8248.
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Goldstein, D.B. & Patel, N.H.** 2007. *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Beck, J.A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J.T. & Festing, M.F.W.** 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics* **24**: 23-25.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L. & Lander, E.S.** 2005. Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* **120**: 169-181.
- Berry, R.J.** 1981. Town mouse, country mouse: adaptation and adaptability in *Mus domesticus* (*M. musculus domesticus*). *Mamm. Rev.* **11**: 91-136.
- Betancourt, A.J., Presgraves, D.C. & Swanson, W.** 2002. A test for faster X evolution in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1816-1819.
- Bímová, B., Karn R.C. & Piálek, J.** 2005. The role of salivary androgen-binding protein in reproductive isolation between two subspecies of house mouse: *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 349-361.
- Bímová, B., Albrecht, T., Macholán, M. & Piálek, J.** 2008. Signalling components of mate recognition system in the house mouse. *Behav. process* (v tisku).
- Bishop, C.E., Boursot, P., Baron, B., Bonhomme, F. & Hatat, D.** 1985. Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* **315**: 70-72.
- Blank, R.D., Campbell, G.R. & D'Eustachio, P.** 1986. Possible derivation of the laboratory mouse genome from multiple wild *Mus* species. *Genetics* **114**: 1257-1269.
- Bolor, H., Wakasugi, N., Zhao, W.D. & Ishikawa, A.** 2006. Detection of quantitative trait loci causing abnormal spermatogenesis and reduced testis weight in the small testis (Smt) mutant mouse. *Experimental Animals* **55**: 97-108.
- Bolor, H., Zhao, W.D., Ishikawa, A. & Wakasugi, N.** 2005. Arrest of spermatogenesis at the early meiotic stage in the small testis mutant (Smt) mice. *Experimental Animals* **54**: 327-337.
- Bonhomme, F., Guénet, J.-L., Dod, B., Moriwaki, K. & Bulfield, G.** 1987. The polyphyletic origin of laboratory inbred mice and their rate of evolution. *Biol. J. Linn. Soc.* **30**: 51-58.

- Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J. & Bonhomme, F.** 1993. The evolution of house mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 119-152.
- Boursot, P., Din, W., Anand, R., Darviche, D., Dod, B., von Deimling, F., Talwar, G.P. & Bonhomme, F.** 1996. Origin and radiation of the house mouse: Mitochondrial DNA phylogeny. *J. Evol. Biol.* **9**: 391-415.
- Brideau, N.J., Flores, H.A., Wang, J., Maheshwari, S., Wang, X. & Barbash, D.A.** 2006. Two Dobzhansky–Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science* **314**: 1292-1295.
- Britton-Davidian, J., Fel-Clair, F., Lopez, J., Alibert, P. & Boursot, P.** 2005. Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: estimates from fertility patterns in wild and laboratory hybrids. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 379-393.
- Broman, K.W.** 2001. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab. Animal.* **30** (7): 44-52.
- Charlesworth, B., Coyne, J.A. & Barton, N.H.** 1987. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Am. Nat.* **130**: 113-146.
- Chevret, P., Jenkins, P. & Catzeflis, F.** 2003. Evolutionary systematics of the Indian mouse *Mus famulus* Bonhote, 1898: molecular (DNA/DNA hybridization and 12S rRNA sequences) and morphological evidence. *Biol. J. Linn. Soc.* **137**: 385-401.
- Christie, P. & Macnair, M.R.** 1987. The distribution of postmating reproductive isolating genes in populations of the yellowmonkey flower, *Mimulus guttatus*. *Evolution* **41**: 571-578.
- Cordell, H.J.** 2002. Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 2463-2468.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A.** 1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* **43**: 362-381.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A.** 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**: 287-305.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A.** 2004. Speciation. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cucchi T., Orth A., Auffray J.-C., Renaud, S., Fabre, L., Catalan, J., Hadjisterkotis, E., Bonhomme, F. & Vigne, J.-D.** 2006. A new endemic species of the subgenus *Mus* (Rodentia, Mammalia) on the Island of Cyprus. *Zootaxa* **1241**: 1-36.
- Dallas, J.F.** 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm. Genome* **3**: 452-456.
- Darvasi, A.** 1998. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genet.* **18**: 19-24
- Davisson, M.T. & Linder, C.C.** 2004: Historical foundations. In: **Bullock H.J., Bullock G. & Petrusz P.** (eds.), *The Laboratory Mouse, The Handbook of Experimental Animals*. Elsevier, London.
- Demuth, J.P. & Wade, M.J.** 2007. Population differentiation in the beetle *Tribolium castaneum*. II. Haldane's rule and incipient speciation. *Evolution* **61**: 694-699.

- Dietrich, W.F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M.J., Ingalls, K.A., O'Connor, T.J., Evans, C.A., DeAngelis, M.M., Levinson, D., Kruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hawkins, T.L., Stein, L., Page, D.C. & Lander, E.S.** 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149-152.
- Divina, P., Vlček, C., Strnad, P., Pačes, V. & Forejt, J.** 2005. Global transcriptome analysis of the C57BL/6J mouse testis by SAGE: evidence for nonrandom gene order. *BMC Genomics* **6**: 29.
- Dobzhansky, T.** 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Dod, B., Jermiin, L.S., Boursot, P., Champan, V.H., Nielsen, J.T. & Bonhomme, F.** 1993. Counterselection on sex chromosomes in the *Mus musculus* European hybrid zone. *J. Evol. Biol.* **6**: 529-546.
- Dod, B., Smadja, C., Karn, R.C. & Boursot, P.** 2005. Testing for selection on the androgen-binding protein in the Danish mouse hybrid zone. *Biol. J. Linn. Soc.* **3**: 447-459.
- Ellegren, H. & Parsch, J.** 2007. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 689-698.
- Elliott, R.W., Miller, D., Pearsall, R., Hohman, C., Zhang, Y., Poslinski, D., Tabaczynski, D.A. & Chapman, V.M.** 2001. Genetic analysis of testis weight and fertility in an interspecies hybrid congenic strain for Chromosome X. *Mamm. Genome* **12**: 45-51.
- Elliott, R.W., Poslinski, D., Tabaczynski, D., Hohman, C. & Pazik, J.** 2004. Loci affecting male fertility in hybrids between *Mus macedonicus* and C57BL/6. *Mamm. Genome* **15**: 704-710.
- Ferris, S.D., Sage, R.D. & Wilson, A.C.** 1982. Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* **295**: 163-165.
- Festing, M.F.W.** 1996: Origin and characteristics of inbred strains of mice. In: **Lyon M.F., Rastan S. & Brown S.D.M.** (eds), *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, 3rd ed. Oxford Univ. Press, Oxford: 1537-1576.
- Flegr, J.** 2005. *Evoluční biologie*. Academia, Praha.
- Forejt, J.** 1981. Hybrid sterility gene located in the T/t-H-2 supergene on chromosome 17, p. 101-131. *Current Trends in Histocompatibility* (Ed. by **Reisfeld, R. S. & Ferrone, R. A.**), Plenum Press, New York.
- Forejt, J.** 1985. Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Expl. Clin. Immunogenet.* **2**: 106-119.
- Forejt, J.** 1996. Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet.* **12**: 412-417.
- Forejt, J. & Iványi, P.** 1975. Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus L.*). *Genet. Res.* **24**: 189-206.
- Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H. & Loudová-Micková, M.** 1991. Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the *Hybrid sterility-1* gene. *Mamm. Genome* **1**: 84-91.

- Forsdyke, D.R.** 2000. Haldane's rule: Hybrid sterility affects the heterogametic sex first because sexual differentiation is on the path to species differentiation. *J. Theor. Biol.* **204**: 443-452.
- Fossella, J., Samant, S.A., Silver, L.M., King, S.M., Vaughan, K.T., Olds-Clarke, P., Johnston, K.A., Mikami, A., Vallee, R.B. & Pilder, S.H.** 2000. An axonemal dynein at the *Hybrid sterility 6* locus: Implications for t haplotype-specific male sterility and the evolution of species barriers. *Mamm. Genome* **11**: 8-15.
- Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomber, C.E., Quimby, F.W. & Smith A.L.** (Eds.) 2007. *The Mouse in Biomedical Research*. Second Edition. Volumes I-IV. Academic Press, New York.
- Frazer, K.A., Eskin E., Kang, H.M., Bogue, M.A., Hinds, D.A., Beilharz, E.J., Gupta, R.V., Montgomery, J., Morenzoni, M.M., Nilsen, G.B., Pethiyagoda, C.L., Stuve, L.L., Johnson, F.M., Daly, M.J., Wade, C.M. & Cox, D.R.** 2007 A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* **448**: 1050-1053.
- Gavrilets, S.** 1997. Evolution and speciation on holey adaptive landscapes. *Trends Ecol. Evol.* **12**: 307-312.
- Glazier, A.M., Naderu, J.H. & Altman, T.J.** 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**: 2345-2349.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C.** 1999. *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford Univ. Press, New York.
- Good, J.M., Dean, M.D. & Nachman, M.W.** 2008a. A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice. *Genetics* **179**: 2213-2228.
- Good, J.M., Handel, M.A. & Nachman, M.W.** 2008b. Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution* **62**: 50-65.
- Gordon, M.** 1927. The genetics of a viviparous top-minnow *Platyopocilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* **12**: 253-283.
- Gregorová, S. & Forejt, J.** 2000. PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol. (Praha)* **46**: 31-41.
- Gregorová, S., Mňuková-Fajdelová, M., Trachtulec, Z., Čapková, J., Loudová, M., Høglund, M., Nakvas, R.M.J., Lehrach, H., Vincek, V., Klein, J. & Forejt, J.** 1996. Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse chromosome 17 including the *hybrid sterility 1* gene. *Mamm. Genome* **7**: 107-113.
- Gregory, S.G., Sekhon, M., Schein, J., Zhao, S., Osoegawa, K., et al.** 2002. A physical map of the mouse genome. *Nature* **418**: 743-750.
- Guénet, J.L.** 2005. The mouse genome. *Genome Res.* **15**: 1729-1740.
- Guénet, J.L. & Bonhomme, F.** 2003. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* **19**: 24-31.
- Guénet, J.L., Nagamine, C.M., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X. & Bonhomme, F.** 1990. *Hst-3*: An X-linked hybrid sterility gene. *Genetical Res.* **56**: 163-165.
- Haldane, J.B.S.** 1922. Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *J. Genet.* **12**: 101-109.

- Hagen, R.H. & Scriber, J.M.** 1989. Sex-linked diapause, color, and allozyme loci in *Papilio glaucus*: Linkage analysis and significance in a hybrid zone. *J. Hered.* **80**: 179-185.
- Harrison, R.G.** 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **7**: 69-128.
- Harrison, J.S. & Buton, R.S.** 2006. Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 559-564.
- Hauffe, H.C.** 1993. Robertsonian fusions and speciation in a house mouse hybrid zone. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Oxford.
- Hayashi, K. & Matsui, Y.** 2006. *Meisetz*, a novel histone tri-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis. *Cell Cycle* **5**: 615-620.
- Hayashi, K., Yoshida, K. & Matsui, Y.** 2005. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**: 374-378.
- Hewitt, G.M.** 1988. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends Ecol. Evolut.* **3** (7): 158-167.
- Hey, J. & Machado, C.A.** 2003. The study of structured populations - New hope for a difficult and divided science. *Nature Rev. Genet.* **4**: 535-543.
- Howard, D.J., Marshall, J.L., Hampton, D.D., Britch, S.C., Draney, M.L., Chu, J.M. & Cantrell, R.G.** 2002. The genetics of reproductive isolation: A retrospective and prospective look with comments on ground crickets. *Amer. Nat.* **159**: S8-S21.
- Hunt, P.A. & Hassold, T.J.** 2002. Sex matters in meiosis. *Science* **296**: 2181-2183.
- Hurst, L.D., Atlan, A. & Bengtsson, B.O.** 1996. Genetic conflicts. *Q. Rev. Biol.* **71**: 317-364.
- Iakoubova, O.A., Olsson, C.L., Dains, K.M., Choi, J., Kalcheva, I., Bentley, L.G., Cunanan, M., Hillman, D., Louie, J., Marchus, M. & West, D.B.** 2000. Microsatellite marker panels for use in high-throughput genotyping of mouse crosses. *Physiol. Genomics* **3**: 145-148.
- Iványi, P., Vojtíšková, M., Démant, P. & Micková, M.** 1969. Genetic factors in the ninth linkage group influencing reproductive performance in male mice. *Folia Biol. (Praha)* **15**: 401-421.
- Jaenike, J.** 2001. Sex chromosome meiotic drive. *Annu. Rev. Ecol. syst.* **32**: 25-49.
- Johanson, N.A. & Kliman, R.M.** 2002. Hidden evolution: progress and limitations in detecting multifarious natural selection. *Genetica* **114**: 281-291.
- Kelly, W.G., Schaner, C.E., Dernburg, A.F., Lee, M.H., Kim, S.K. Villeneuve, A.M. & Reinke, V.** 2002. X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development* **129**: 479-492.
- Khil, P.P., Smirnova, N.A., Romanienko, P.J. & Camerini-Otero, R.D.** 2004. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* **36**: 642-646.
- Klein, J., Sipos, P. & Figueroa, F.** 1984. Polymorphism of t-complex genes in European wild mice. *Genet. Res.* **44**: 39-46.
- Lazarová, J.** 1999. Epigenetic variation and fluctuating asymmetry of the house mouse (*Mus*) in the Czech Republic. *Folia Zool.* **48**: 37-52.

- Lifschytz, E. & Lindsley, D.L.** 1972. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 182-186.
- Love, J.M., Knight, A.M., Mc Aleer, M.A. & Todd, J.A.** 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR analysed microsatellites. *Nucleic Acids Research* **18** (14): 4123-4130.
- Lundrigan, B.L., Jansa, S.A. & Tucker, P.K.** 2002. Phylogenetic relationships in the genus *Mus*, based on paternally, maternally and biparentally inherited characters. *Syst. Biol.* **51**: 410-431.
- Macholán, M., Kryštufek, B. & Vohralík, V.** 2003. The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: Clues from morphology. *Acta Theriol.* **48**: 177-188.
- Macholán, M., Munclinger, P., Šugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J. & Piálek, J.** 2007a. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* **61**: 746-771.
- Macholán, M., Vyskočilová, M., Bejček, V. & Šťastný, K.** Mitochondrial DNA sequence variation and evolution of Old World house mice including a new divergent lineage from Socotra (Yemen). Odesláno.
- Macholán, M., Vyskočilová, M., Bonhomme, F., Kryštufek, B., Orth, A. & Vohralík, V.** 2007b. Genetic variation and phylogeography of free-living mouse species (genus *Mus*) in the Balkans and the Middle East. *Mol. Ecol.* **16**: 4774-4788.
- Macholán, M. & Zima, J.** 1994. *Mus domesticus* in Western Bohemia: A new mammal for the Czech Republic. *Folia Zool.* **43**: 39-41.
- Mackay, T.F.C.** 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 303-339.
- Manly, K.F., Cudmore, R.H. & Meer, J.M.** 2001. Map manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm. Genome* **12**: 930-932.
- Masly, J.P. & Presgraves, D.C.** 2007. High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **5** (9): e243.
- Matsuda, Y., Moens, P.B. & Chapman, V.M.** 1992. Deficiency of X and Y chromosomal pairing at meiotic prophase in spermatocytes of sterile interspecific hybrids between laboratory mice (*Mus domesticus*) and *Mus spretus*. *Chromosoma* **101**: 483-492.
- Mayr, E.** 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, N. Y.
- McCarrey, J.R., Watson, C., Ostermeier, G.C., Marahrens, Y., Jeanish, R. & Krawetz, S.A.** 2002. X-chromosome inactivation during spermatogenesis is regulated by an Xist/Tsix-independent mechanism in the mouse. *Genesis* **34**: 257-266.
- Michalak, P. & Noor, M.A.F.** 2003. Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1070-1076.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlček, C., Schimenti, J.C. & Forejt, J.** 2008. *Hybrid sterility 1* locus encodes a meiotic histone H3 methyltransferase gene. V recenzním řízení.
- Mouse Genome Sequencing Consortium** 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562.
- Muller, H.J.** 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol. Symp.* **6**: 71-125.

- Munclinger, P., Božíková, E., Šugerková, M., Piálek, J. & Macholán, M.** 2002. Genetic variation in house mice (*Mus*, Muridae, Rodentia) from the Czech and Slovak Republics. *Folia Zool.* **51**: 81-92.
- Musser, G.G. & Carleton, M.D.** 2005. Superfamily Muroidea, p 894-1531. In: **Wilson, D.E., Reeder, D.A.M.** (Eds.), *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Nagamine, C.M., Nishioka, Y., Moriwaki, K., Boursot, P., Bonhomme, F. & Lau, Y.F.C.** 1992. The musculus-type Y chromosome of the laboratory mouse is of Asian origin. *Mamm. Genome* **3**: 84-91.
- Namekawa, S.H., VandeBerg, J.L., McCarrey, J.R. & Lee J.T.** 2007. Sex chromosome silencing in the marsupial male germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 9730-9735.
- Nishioka, Y.** 1987. Y-chromosomal DNA polymorphism in mouse inbred strains. *Genet Res.* **50**: 69-72.
- Oka, A., Aoto, T., Totsuka, Y., Takahashi, R., Ueda, M., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Kuriki, S., Takagi, N., Moriwaki, K. & Shiroishi, T.** 2007. Disruption of genetic interaction between two autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. *Genetics* **175**: 185-197.
- Oka, A., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Takagi, N., Takano-Shimizu, T., Toshimori, K., Moriwaki, K. & Shiroishi, T.** 2004. Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics* **166**: 913-924.
- Orr, H.A.** 1995. The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics* **139**: 1805-1813.
- Orr, H.A.** 1997. Haldane's rule. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 195-218.
- Orr, H.A.** 2005. The genetic basis of reproductive isolation: Insights from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (Suppl. 1): 6522-6526.
- Orr, H.A., Masly, J.P. & Phadnis, N.** 2007. Speciation in *Drosophila*: from phenotypes to molecules. *J. Hered.* **98**: 103-110.
- Orr, H.A., Masly, J.P. & Presgraves, D.C.** 2004. Speciation genes. *Curr. Opin. Genetics Dev.* **14**: 1-5.
- Orr, H.A. & Presgraves, D.C.** 2000. Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. *BioEssays* **22**: 1085-1094.
- Orr, H.A. & Turelli, M.** 2001. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution* **55**: 1085-1094.
- Orth, A., Belkhir, K., Britton-Davidian, J., Boursot, P., Benazzou, T. & Bonhomme, F.** 2002. Natural hybridisation between two sympatric species of mice *Mus musculus domesticus* L. and *Mus spretus* Lataste. *Comptes Rendus Biologies* **325**: 89-97.
- Patterson, J.T. & Stone, W.S.** 1952. *Evolution in the genus Drosophila*. Macmillan and Co., New York.
- Payseur, B.A. & Hoekstra, H.E.** 2005. Signatures of reproductive isolation in patterns of single nucleotide diversity across inbred strains of mice. *Genetics* **171**: 1905-1916.

- Payseur, B.A., Krenz, J.G. & Nachman, M.W.** 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* **58**: 2064-2078.
- Payseur, B.A. & Nachman, M.W.** 2005. The genomics of speciation: investigating the molecular correlates of X chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus domesticus* and *Mus musculus*. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 523-534.
- Payseur, B.A. & Place, M.** 2007. Searching the genomes of inbred mouse strains for incompatibilities that reproductively isolate their wild relatives. *J. Hered.* **98** (2): 115-122.
- Perez, D.E. & Wu, C.I.** 1995. Further characterization of the *Odysseus* locus of hybrid sterility in *Drosophila*: one gene is not enough. *Genetics* **140**: 201-206.
- Perez, D.E., Wu, C.I., Johnson, N.A. & Wu, M.L.** 1993. Genetics of reproductive isolation in the *Drosophila* simulans clade: DNA marker-assisted mapping and characterization of a hybrid-male sterility gene, *Odysseus* (*Ods*). *Genetics* **134**: 261-275.
- Petkov, P.M., Cassell, M.A., Sargent, E.E., Donnelly, C.J., Robinson, P., Crew, V., Asquith, S., Vonder Haar, R. & Wiles, M.V.** 2004. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* **83**: 902-911.
- Piálek, J., Hauffe, H.C., Rodríguez-Clark, K.M. & Searle, J.B.** 2001. Rociation and speciation in house mice from the Alps: The role of chromosomes. *Mol. Ecol.* **10**: 613-625.
- Piálek, J., Hauffe, H.C. & Searle, J.B.** 2005. Chromosomal variation in the house mouse. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 535-563.
- Piálek, J., Vyskočilová, M., Bímová, B., Havelková, D., Piálková, J., Dufková, P., Bencová, V., Ďureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H.C., Macholán, M., Munclinger, P., Storchová, R., Zajícová, A., Holáň, V., Gregorová, S. & Forejt, J.** 2008. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *J. Hered.* **99**: 34-44.
- Pilder, S.H.** 1997. Identification and linkage mapping of *Hst7*, a new *M. spretus*/*M. m. domesticus* chromosome 17 hybrid sterility locus. *Mamm. Genome* **8**: 290-291.
- Pilder, S.H., Hammer, M. & Silver, L.M.** 1991. A novel mouse chromosome 17 hybrid sterility locus: Implications for the origin of t haplotypes. *Genetics* **129**: 237-246.
- Pilder, S.H., Olds-Clarke, P., Phillips, D.M. & Silver, L.M.** 1993. *Hybrid sterility-6*: a mouse t complex locus controlling sperm flagellar assembly and movement. *Dev. Biol.* **159**: 631-642.
- Prager, E.M., Orrego, C. & Sage, R.D.** 1998. Genetic variation and phylogeography of Central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. *Genetics* **150**: 835-861.
- Presgraves, D.C.** 2002. Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* **56**: 1168-1183.
- Presgraves, D.C.** 2008. Sex chromosomes and speciation in *Drosophila*. *Trends Genet.* **24**: 336-343.
- Presgraves, D.C., Balagopalan, L., Abmayr, S.M. & Orr, H.A.** 2003. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. *Nature* **423**: 715-719.

- Ramsey, J.M. & Schemske, D.W.** 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**: 477-501.
- Raufaste, N., Orth, A., Belkhir, K., Senet, D., Smadja, C., Baird, S.J.E., Bonhomme, F., Dod, B. & Boursot, P.** 2005. Inferences of selection and migration in the Danish house mouse hybrid zone. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 593-616.
- Reed, L.K. & Markow, T.A.** 2004. Early events in speciation: polymorphism for hybrid male sterility in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 9009-9012.
- Robertson, W.R.B.** 1916. Chromosome studies I. Taxonomic relationship shown in the chromosomes of *Tettyidae* and *Acrididae*. V-shaped chromosomes and their significance in *Acrididae*, *Locustidae* and *Gryllidae*: chromosomes and variation. *J. Morphol.* **27**: 179-331
- Sage, R.D., Atchley, W.R. & Capanna, E.** 1993. House mice as models in systematic biology. *Syst. Biol.* **42**: 523-561.
- Samant, S.A., Fossella, J., Silver, L.M. & Pilder, S.H.** 1999. Mapping and cloning recombinant breakpoints demarcating the *hybrid sterility 6*-specific sperm tail assembly defekt. *Mamm. Genome* **10**: 88-94.
- Samant, S.A., Ogunkua, O.O., Hui, L., Lu, J., Han, Y., Orth, J.M. & Pilder, S.H.** 2005. The mouse t complex distorter/sterility candidate, *Dnahc8*, expresses a gamma-type axonemal dynein heavy chain isoform confined to the principal piece of the sperm tail. *Dev. Biol.* **285**: 57-69.
- Sawamura, K., Roote, S., Wu, C.-I. & Yamamoto, M.T.** 2004. Genetic complexity underlying hybrid male sterility in *Drosophila*. *Genetics* **166**: 789-796.
- Schliekelman, P.** 2008. Statistical power of expression quantitative trait loci for mapping of complex trait loci in natural populations. *Genetics* **178** (4): 2201-2216.
- Shuker, D.M., Underwood, K., King, T.M. & Bublin, R.K.** 2005. Patterns of male sterility in a grasshopper hybrid zone imply accumulation of hybrid incompatibilities without selection. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **272**: 2491-2497.
- Silver, L.M.** 1995: *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford Univ. Press, N. Y.
- Soller, M. & Brody, T.** 1976. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **47**: 35-39.
- Stebbins, G. L.** 1958. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv. Genet.* **9**: 147-215.
- Storchová, R., Gregorová S., Buckiová D., Kyselová, V., Divina, P. & Forejt, J.** 2004. Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mamm. Genome* **15**: 515-524.
- Sun, S., Ting, C.T. & Wu, C.I.** 2004. The normal function of a speciation gene, *Odyseus*, and its hybrid sterility effect. *Science* **305**: 81-83.
- Sweigart, A.L., Mason, A.R. & Willis, J.H.** 2007. Natural variation for a hybrid incompatibility between two species of *Mimulus*. *Evolution* **61**: 141-151.

- Tao, Y., Chen, S., Hartl, D.L. & Laure, C.C.** 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**: 1383-1397.
- Teeter, K.C., Payseur, B.A., Harris, L.W., Bakewell, M.A., Thibodeau, L.M., O'Brien, J.E., Krenz, J.G., Sans-Fuentes, M.A., Nachman, M.W. & Tucker, P.K.** 2008. Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. *Genome Res.* **18**: 67-76.
- Ting, C.T., Tsauro, S.C., Wu M.L. & Wu, C.-I.** 1998. A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* **282**: 1501-1504.
- Thornton, K., Bachtrog, D. & Andolfatto, P.** 2006. X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: No evidence for faster-X protein evolution. *Genome Res.* **16**: 498-504.
- Threadgill, D.W., Hunter, K.W. & Williams, R.W.** 2002: Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort. *Mamm. Genome* **13**: 175-178.
- Trachtulec, Z., Mihola, O., Vlček, C., Himmelbauer, H., Paces, V. & Forejt, J.** 2005. Positional cloning of the *Hybrid sterility 1* gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 637-641.
- Trachtulec, Z., Mnuková-Fajdelová, M., Hamvas, R.M.J., Gregorová, S., Mayer, W.E., Lehrach, H. R., Forejt, J. & Klein, J.** 1997. Isolation of candidate *Hybrid sterility 1* genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mamm. Genome* **8**: 312-316.
- Trachtulec, Z., Vincek, V., Hamvas, R.M.J., Forejt, J., Lehrach, H.R. & Klein, J.** 1994. Physical map of mouse chromosome 17 in the region relevant for positional cloning of the *Hybrid sterility 1* gene. *Genomics* **23**: 132-137.
- Trachtulec, Z., Vlček, C., Mihola, O., Gregorová, S., Fotopulosová, V. & Forejt, J.** 2008. Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics* **178**: 1777-1785.
- True, J.R., Weir, B.S. & Laure, C.C.** 1996. A genome-wide survey of hybrid incompatibility factors by the introgression of marked segments of *Drosophila mauritiana* chromosomes into *Drosophila simulans*. *Genetics* **142**: 819-837.
- Tsuchihashi, Z. & Dracopoli, N.C.** 2002. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics J.* **2**: 103-110.
- Tucker, P.K., Sage, R.D., Warner, J., Wilson, A.C. & Eicher, E.M.** 1992. Abrupt cline for sex chromosomes in a hybrid zone between two species of mice. *Evolution* **46**: 1146-1163.
- Tucker, P.K., Sandstedt, S.A. & Lundrigan, B.L.** 2005. Phylogenetic relationships in the subgenus *Mus* (genus *Mus*, family Muridae, subfamily Murinae): examining gene trees and species trees. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 653-662.
- Turelli, M.** 1998. The cause of Haldane's rule. *Science* **282**: 889-891.
- Turelli, M. & Moyle, L.C.** 2007. Asymmetric postmating isolation: Darwin's corollary to Haldane's rule. *Genetics* **176**: 1059-1088

- Turelli, M. & Orr, H.A.** 2000. Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* **154**: 1663-1679.
- Turner, J.M.A.** 2007. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**: 1823-1831.
- Vyskočilová, M., Pražanová, G. & Piálek, J.** 2008. Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17. Odesláno.
- Vyskočilová, M., Trachtulec, Z., Forejt, J. & Piálek, J.** 2005. Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biol. J. Linn. Soc.* **84**: 663-674.
- Wade, C.M. & Daly, M.J.** 2005: Genetic variation in laboratory mice. *Nat. Genet.* **37**: 1175-1180.
- Wade, M.J. & Johnson, N.A.** 1994. Reproductive isolation between two species of flour beetles, *Tribolium castaneum* and *T. freemani*: variation within and among geographical populations of *T. castaneum*. *Heredity* **72**: 155-162.
- Wade, C.M., Kulbokas, E.J., Kirby, A.W., Zody, M.C., Mullikin, J.C., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K. & Daly, M.J.** 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**: 574-578.
- Wang, P.J., McCarrey, J.R., Yang, F. & Page, D.C.** 2001. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.* **27**: 422-426.
- Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Maueler, W., Raulf, F., Telling, A., Robertson, S.M. & Schartl, M.** 1989. Novel putative receptor tyroxine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphophorus*. *Nature* **341**: 415-421.
- Wojcik, J.M., Ratkiewicz, M. & Searle, J.B.** 2002. Evolution of the common shrew *Sorex araneus*: chromosomal and molecular aspects. *Acta Theriol (Warsz)* **47**: 139-167.
- Wu, C.I. & Davis, A.W.** 1993 Evolution of postmating reproductive isolation: The composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am. Nat.* **142**: 187-212.
- Yang, H., Bell T.A., Churchill G.A. & DeVillena, F.P.** 2007. On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat. Genet.* **39**: 1100-1107.
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Miyashita, N., Matsushima, Y., Shi, L.-I., Cho, W.S., Zhen, X.L. & Tagashira, Y.** 1988. Hybrid origin of Japanese mice "*Mus musculus molossinus*": Evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 63-78.
- Yoshiki, A., Moriwaki, K., Sakakura, T. & Kusakabe, M.** 1993. Histological studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mouse strain. *Dev. Growth Diff.* **35**: 271-281.

Článek A

Does Geography Matter in Hybrid Sterility in House Mice?

Biological Journal of the Linnean Society 84: 663-674 (2005)

VYSKOČILOVÁ, M., TRACHTULEC, Z., FOREJT, J. & PIÁLEK, J.

V této práci jsem se podílela na přípravě experimentálního křížení myší, vyšetření plodnosti samců, provedla jsem molekulárně genetickou analýzu oblasti *Hst1* a podílela jsem se na psaní publikace.

The genus *Mus* as a model for evolutionary studies

Edited by J. Britton-Davidian and J. B. Searle

Does geography matter in hybrid sterility in house mice?

MARTINA VYSKOČILOVÁ^{1,2}, ZDENĚK TRACHTULEC³, JIŘÍ FOREJT³ and
JAROSLAV PÍÁLEK^{1*}

¹Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, CZ-675 02 Studenec 122, Czech Republic

²Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ-602 00 Brno, Czech Republic

³Institute of Molecular Genetics and Centre of Integrated Genomics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videňská 1083, CZ-142 20 Praha 4, Czech Republic

Received 7 November 2003; accepted for publication 7 October 2004

Hybrid sterility can prevent gene flow between diverging subpopulations and hence might contribute to speciation. The *hybrid sterility 1* (*Hst1*) gene was originally described in male progeny obtained from a cross between laboratory inbred mouse strains C57BL/10 and C3H, and wild *Mus musculus musculus*, sampled at localities in Prague, Czech Republic. This study asked whether the presence of sterility associated with the *Hst1* gene is limited to one local population or is extended over geographically distant regions. We studied the progeny derived from a wild population of *M. m. musculus* sampled in Studenec, Czech Republic, 160 km south-east from Prague, crossed reciprocally to C57BL/10 mice. Spermatogenesis was examined in 251 hybrid males; among them 109 males (43.4%) were sterile and 142 (56.6%) were fertile. Sterile males had significantly lower testis mass and lower epididymis mass compared with fertile males. The size of the reproductive organs was dependent on cross reciprocity within the classes of sterile and fertile males. Although our phenotype data resemble those presented in the original description of *Hst1*, molecular analysis revealed incomplete segregation of sterility and fertility in male progeny and markers from the *Hst1* region in some families. Therefore, there are probably additional genes affecting hybrid sterility that are polymorphic in wild *M. m. musculus*. © 2005 The Linnean Society of London, *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 84, 663–674.

ADDITIONAL KEYWORDS: inbred strain – male sterility – *Mus musculus* – spermatogenesis – testis mass.

INTRODUCTION

Two house mouse subspecies, *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*, meet and form a narrow hybrid zone, which runs across Europe (Boursot *et al.*, 1993; Sage, Atchley & Capanna, 1993; Macholán, Kryštufek & Vohralík, 2003; see also Božíková *et al.*, 2005, this issue; Dod *et al.*, 2005, this issue; Raufaste *et al.*, 2005, this issue). Despite long-standing interest in studying this hybrid zone, there is no direct evidence from wild mice of the mechanisms which keep the two mouse

genomes separate (Boursot *et al.*, 1993; Sage *et al.*, 1993). Hybrid sterility is one of the reproductive isolating barriers that can prevent gene flow between diverging populations (Coyne & Orr, 1998; Howard *et al.*, 2002) and is also well-documented in the laboratory mouse (Forejt, 1996 and references therein). In particular, the study of the *hybrid sterility 1* (*Hst1*) gene could be of great importance in understanding the genetics of mouse speciation because it was described from crosses between *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*.

Hst1 was the first genetically dissected gene to be described in mammals (Forejt & Iványi, 1975). When

*Corresponding author. E-mail: jpialek@brno.cas.cz

the laboratory inbred strain C57BL/10 (herein referred to as B10) is crossed with some wild *M. m. musculus*, the resulting male F₁ hybrids are sterile. The phenotypic effect of sterility is characterized by complete arrest of spermatogenesis at the pachytene stage of primary spermatocytes indicating a cell autonomous, germ-cell specific defect (Iványi *et al.*, 1969; Yoshiki *et al.*, 1993). Sterile males have reduced mass of testes and no sperm in the ductus epididymis, but normal levels of testosterone in the blood (Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1985). The F₁ hybrid females from the same cross are fertile (Forejt & Iványi, 1975); this means the sterility obeys Haldane's rule (Haldane, 1922). Another laboratory inbred strain, C3H/Di, produced fertile progeny when crossed with wild *M. m. musculus*. The difference between the C3H/Di and B10 mice with respect to the fertility phenotype was attributed to a gene, mapped to mouse chromosome 17 within the region delimited by the *T* and *H2* loci in the wild-type form of the *t*-complex region (Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1981; Forejt *et al.*, 1991).

The nomenclature of *Hst1* alleles reflects the outcome of crosses between wild and laboratory mice. Chromosome 17 in the B10 strain was suggested to carry the *Hst1^s* (sterility ensuring) allele, while chromosome 17 in the C3H strain was suggested to carry the *Hst1^f* (fertility ensuring) allele. The gene located on chromosome 17 of wild *M. m. musculus* mice was named *Hst^w*, with two alleles, *Hst^{us}* and *Hst^{wf}*. The *Hst^w* gene, polymorphic in wild males, has been located in the same linkage group as *Hst1*; nevertheless, there has been no direct evidence as yet that this gene occupies the same locus, i.e. that it is identical to the *Hst1* gene (Forejt & Iványi, 1975).

Allelic interactions at the *Hst1* locus define the phenotypic effect: only the combination *Hst1^s/Hst^{us}* ensures sterility; all other homozygous or heterozygous forms are fertile (Forejt & Iványi, 1975; Forejt, 1985; Forejt *et al.*, 1991; Forejt, 1996). The single-gene inheritance of hybrid sterility is true only for crosses between laboratory and wild (W) mice: W × (B10 × C3H). If, however, the fertile hybrid females from crosses of wild and laboratory mice (B10 × W) are used for further crosses ((B10 × W) × B10), then genetic control of male sterility is much more complex. The male progeny delivered from such backcrosses display almost continuous variation, from full spermatogenic arrest to complete fertility, suggesting the interaction of about three nonallelic genes (Forejt & Iványi, 1975).

The *Hst1* gene causes male sterility only between *M. m. musculus* and laboratory strains considered to be derived from *M. m. domesticus*. Other hybrid sterility genes in mice have been described from crosses between laboratory strains and *M. spretus* (Guénet *et al.*, 1990; Pilder, Hammer & Silver, 1991; Pilder

et al., 1993; Pilder, 1997), taxa which hybridize only rarely in nature (Orth *et al.*, 2002).

This report is part of a three-step project we designed to study the potential effects of hybrid sterility on the pattern and dynamics of the hybrid zone between *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*. In the first step, individuals from a wild population of *M. m. musculus* were crossed with B10. Using this standard laboratory strain, we basically repeated the experiment performed in Forejt's laboratory in the 1960s and 1970s (Forejt & Iványi, 1975). Although the B10 strain has traditionally been considered to represent predominantly the *M. m. domesticus* genome, molecular analyses have shown genomes of most old ('classical') inbred strains (including B10) to be mosaics of a number of various segments derived from *domesticus*, *musculus* and *castaneus* sources (Bishop *et al.*, 1985; Bonhomme *et al.*, 1987; Nagamine *et al.*, 1992; Wade *et al.*, 2002). Therefore, the results of this first experiment may be of limited value for assessing the evolutionary significance of male sterility upon hybridization in natural populations of mice. In the second step, we aimed to study hybrid sterility in completely natural populations of mice using the *M. m. musculus* mice tested in the first step and replacing the B10 mice with wild *M. m. domesticus* sampled near the hybrid zone. Finally, we will determine the extent of hybrid sterility polymorphism by testing geographically distant populations of *M. m. domesticus*.

In this paper we report on data obtained during the first step of the project. We specifically asked if sterile males were produced irrespective of the direction of the cross. Also, as little effort had been put into evaluating the geographical extent of hybrid sterility within *M. m. musculus* populations, we tested whether male sterility associated with the *Hst1* gene is a unique trait of local Prague populations. Therefore, a sample of wild mice from a geographically distant population in Moravia, Czech Republic, was used instead of wild or inbred mice originating in Prague (Forejt & Iványi, 1975; Gregorová & Forejt, 2000). The analysis of spermatogenesis in male offspring derived from crosses between these mice and the B10 strain proved that hybrid sterility could be found widely in populations of *M. m. musculus* and that spermatogenic breakdown was independent of the direction of the cross. Sterile males had significantly lower testis mass and lower epididymis mass compared with fertile males. These phenotypic data correspond closely with those ascertained in the original description of the *Hst1* gene (Forejt & Iványi, 1975). Molecular analysis using six DNA markers which map within and around the *Hst1* region on chromosome 17 failed to reveal complete association between these markers and the presence/absence of sperm in hybrid males.

Further studies will be necessary to show whether the genes causing hybrid sterility in mice of the two *M. m. musculus* populations are identical.

MATERIAL AND METHODS

MICE

Wild mice were sampled in the village of Studenec, Czech Republic (49°11'N, 16°03'E) in November 2000. The population was located within the *M. m. musculus* range for the Czech Republic, as delineated by Munclinger *et al.* (2002). To confirm that these mice were of *M. m. musculus* origin, we genotyped individuals for four diagnostic markers: the presence/absence of (1) the *Bam*HI restriction site in mitochondrial DNA (Boursot *et al.*, 1996; Božíková *et al.*, 2005, this issue); (2) an 18-bp deletion located within the *Zinc finger protein 2* gene on the Y chromosome (Nagamine *et al.*, 1992; Boissinot & Boursot, 1997); (3) the B1 insertion in the *Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase* gene on the X chromosome (Munclinger, Boursot & Dod, 2003); (4) the PCR product using subspecies-specific primers within the *Androgen-binding protein alpha* gene on chromosome 7 (Dod *et al.*, 2005, this issue; B. Bimová, unpubl. data). All markers were of the *musculus* type with no sign of introgression (data not shown). The mice of the B10 strain were purchased from a local provider (Velaz, Praha). All mice were kept under standard conditions in a breeding facility in Studenec (perspex cages measuring 30 × 15 × 15 cm, food and water available *ad libitum*, 14 : 10 photoperiod, with light on between 06:30 h and 20:30 h).

EXPERIMENTAL MATING

Experimental crosses with the mice were started after 2 weeks of keeping them in isolation following the design shown in Figure 1. Assuming a roughly bimodal distribution for the presence or absence of sterility in the offspring if the parental individuals were heterozygotes for the hybrid sterility gene, we planned to use at least eight individuals per cross. Because of unknown age of wild animals we first derived progeny from ten pairs propagated within the sampled population. The two generations are referred to here as G₀ and G₁ generations (Fig. 1). Eleven G₁ males and 30 G₁ females were mated with B10 individuals. To distinguish the direction of each cross we always present the female first (for example, female G₁ × male B10 is abbreviated to G₁ × B10). Usually, one male was paired with several females in one large cage and the females were examined for pregnancy every third day. Pregnant females were removed, housed singly in a standard cage and checked daily for the presence of a litter. F₁ hybrids were weaned at 20 days of age. After

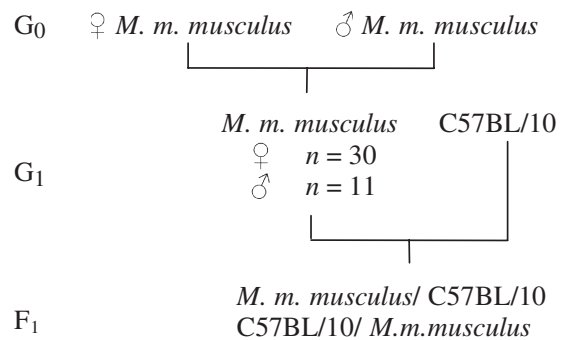


Figure 1. Scheme of experimental crosses used to derive males scored for sterility.

weaning all males were housed individually or with two per cage. In the latter case, the males were separated after 55 days and housed singly for five days to remove the effect on sperm count of social structure among cage mates.

PHENOTYPE SCORING

All males were phenotyped at 60 days of age. Animals were sacrificed, three external measurements were taken (body mass and length and tail length), and the spleen was removed and preserved in 96% ethanol for molecular analysis. In addition, the left testis and epididymis were weighed immediately after dissection; the length and width of the left testis were also measured. The whole left epididymis was transferred into 1 mL 1% sodium citrate solution in a watchglass, cut with scissors into tiny pieces, and squashed with a pair of tweezers. Another 1 mL 1% sodium citrate solution was added and the suspension was mixed thoroughly using a pipette and left for 15 min. After maceration, the suspension was pipetted again and applied to a Bürker haematocytometer. If sperm were present, we counted sperm heads in five chambers selected arbitrarily. The number of sperm characterizing each hybrid male is presented as the average sperm count (ASC) over five chambers.

MOLECULAR ANALYSIS

A small piece of ethanol-preserved tissue was digested in extraction buffer (100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1% SDS) and proteinase K (20 µg/mL). DNA was extracted using a standard phenol-chloroform procedure (Hoelzel, 1992).

Two markers located outside and four markers located within the *Hst1* region on chromosome 17 (Fig. 2) were scored to find the association between the *Hst1* gene and sterility in hybrid progeny. The presence of male sterility can be masked by the detrimen-

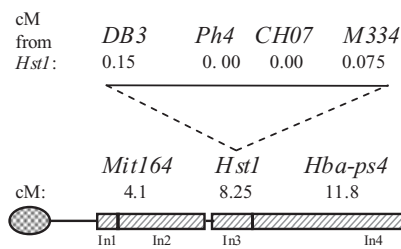


Figure 2. Diagram of the *t*-complex region of wild-type (non-*t*) origin on the proximal part of chromosome 17. Boxes In1–In4 indicate four inversions associated with the *t* haplotype. Distances of *D17Mit164*, *Hst1* and *Hba-ps4* are in centiMorgans (cM) relative to the centromere (ellipse at the left). Map positions of four markers spanning the *Hst1* region are shown above in the enlargement and their distances are in cM relative to the *Hst1* gene.

tal effect of *t* haplotypes on male fitness. Most *t* haplotypes carry recessive lethal mutations (Bennett, 1975). Mice homozygous for the same lethal *t* haplotype die at early stages of development, while individuals carrying two different *t* haplotypes with complementing lethal or semilethal factors are viable, but male-sterile (Silver, 1985). To distinguish between these two alternative causes of male sterility, we genotyped mice for the presence of *t* haplotype-specific microsatellite marker *Hba-ps4*, located in the distal part of the *t*-complex, using the protocol by Schimenti & Hammer (1990). From the proximal part of the *t*-complex we used microsatellite marker *D17Mit164* (Dietrich *et al.*, 1996).

The markers from the *Hst1* region were designed in the Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic. In a pilot study, 17 markers from the *Hst1* region were tested for length polymorphism in *M. m. musculus* DNA samples using PCR. One marker, DB3, found within this region has been presented elsewhere (Trachtulec *et al.*, 2005, this issue) and three other suitable markers, CH07, M334 and Ph4, are presented here. The forward and reverse primers of the first two markers were CH07F (5'-TTGCTATAAAAAGGACTGTTTGAT) and CH07L (5'-ACACAAAGACAGAAGAAGAGGA); M334F (5'-TGTTACTGGTTATCATCCTC) and M334L (5'-GGCTTGGTATTTTCTCCTTAG). The last primer flanked an inserted element RLTR10 in the intron of the *D17Ph4e* gene. Because the original primers amplified long fragments, not suitable for routine scoring, new primers flanking the RLTR10 element were designed by Pavel Munclinger using the programme Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). The sequences of these new primers were: Ph4INF (5'-CTGGGTCCTC CAATCTAGCA) and Ph4INR (5'-GATTGAGGTGA GCCCAAGAG).

An aliquot of 50 ng genomic DNA was amplified using the gradient RoboCycler thermal cycler (Stratagene) in a 10- μ L PCR reaction mix with 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.5 U *Taq* polymerase and 0.3 μ M each primer. The reactions were amplified for 38 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 40 s and 72 °C for 40 s. The only exception was DB3, which was amplified for 38 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. PCR products were separated on 5% agarose gels, except for the Ph4 fragments, which were separated on 2% agarose gels. Figure 2 shows a map of all markers.

STATISTICAL ANALYSIS

To analyse the effects of measured variables, we grouped the male offspring according to the original wild-caught G₀ females. In the case of the G₁ \times B10 cross, the descendants of as many as four G₁ females were pooled together, while in the B10 \times G₁ cross, the descendants of one wild-derived male were usually grouped. Descriptive statistics were calculated for these groups.

Logistic regression was used to fit the probability of the presence of sterile and fertile males to a linear model which included the effects of phenotypic variables. The Newton iteration process was applied to fit a model; this process stops when the log-likelihood (LL) reaches its minimum. When finished, it counts the difference in LL between the full model, which includes regressing variables, and the reduced model, which has only intercepts. Twice the value of the difference in negative log-likelihoods, 2LL, approximates a chi-square distribution, and this value was used to test the significance of the full model.

The effects of the direction of the cross (G₁ \times B10 vs. B10 \times G₁) in sterile and fertile males were estimated by Student's *t*-tests. Due to the design of crosses in which we mated one male with several females, we introduced additional genetic variability into the cross between G₁ females and B10 males. This might result in unequal variance of the measured variables between the two types of crosses. Therefore, in all *t*-tests we assumed unequal variances among reciprocal tests and accounted for this factor in statistical analyses. JMP statistical software (SAS Institute Inc., 2002) was used for all analyses.

RESULTS

DEFINING MALE STERILITY

Forejt & Iványi (1975) described a close relationship between the paired testes mass and fertility of hybrid males. The fertility was estimated from the number of offspring sired by single males (wild *M. m. musculus*) paired with single females (B10) for 1 month. The

authors showed that the number of offspring in such matings is dependent on the testes mass and determined that hybrid males with a testes mass lower than 75 mg are sterile, whereas normal fertility was ensured by testes heavier than 120 mg. A testes mass in the range of 75–120 mg reflects continuous variation from complete sterility to fertility.

We used the relationship described above to define sterility of hybrid males in our crosses. Because we did not measure fitness of males directly in terms of the numbers of offspring produced by hybrid males, we related testes mass to ASC. The rationale behind this approach was that fertility has been shown repeatedly to be a function of the number of sperm produced in the testes and stored in the epididymides (e.g. Searle & Beechey, 1974; Forejt & Iványi, 1975); therefore, we expected that distinct groups of fertile and sterile males would be clustered separately. These two clusters can be visualized either in a morphospace defined by testis mass and ASC or in histograms showing the distribution for the scored traits.

The relationship between left testis mass and ASC are plotted in Figure 3 for progeny of both crosses. Both panels indicate the presence of two clusters: first, there were numerous males with low testis mass and ASC = 0, and second, there were males with both heavy testis and high ASC scores. However, a small proportion of males displayed rather larger testes but with low scores of ASC, contrary to expectation (we discuss this pattern below).

To define hybrid male sterility in our crosses we looked at the distributions of single traits. As reasoned above we expected to find two peaks, one each associated with sterility and fertility. Defining a nonoverlapping region, if the two distributions are separated, or a point of intersection, if the distributions overlap, would help define the limits between sterility and fertility. We found the deepest trough in values for distributions of ASC at level ASC = 5 (Fig. 4, upper panels). Based on these findings we defined sterile males as those with ASC < 5, while we considered fertile males to be those with ASC ≥ 5.

Several lines of evidence have indicated that some males having few sperm in their epididymides are sterile. We observed a high proportion of abnormal sperm heads in a category of males with low ASC scores. Furthermore, histological studies have revealed that few spermatogonia can escape the spermatogenic block and differentiate to sperm (Yoshiki *et al.*, 1993). Finally, Searle & Beechey (1974) reported that reduced fertilization is likely in mice whenever sperm counts fall to less than 10% of normal. All these data suggest that the limiting value of the sperm count estimated from the trough in histograms of ASC represents a reliable estimator of sterility in hybrid males.

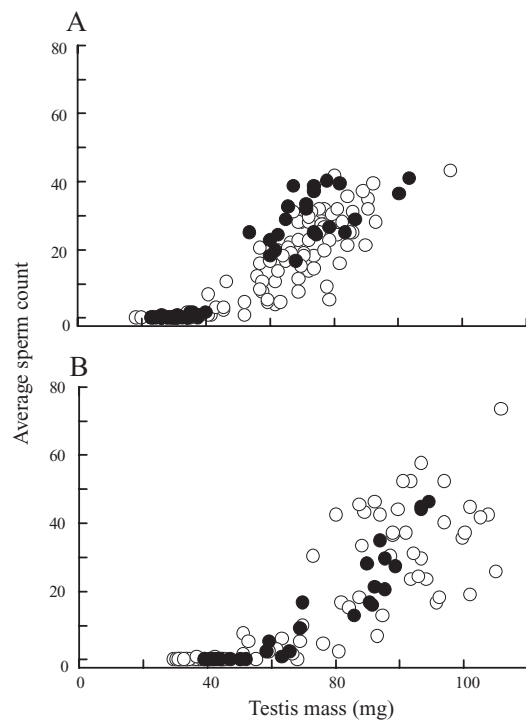


Figure 3. Relationship between average sperm count and testis mass plotted for both reciprocal crosses: B10 × *Mus musculus musculus* (A) and *M. m. musculus* × B10 (B). White circles depict males which could be scored for phenotype traits only; black circles indicate males involved in molecular analysis of segregation between sterility and the *Hst1* region.

PHENOTYPIC DATA

Of ten pairs of wild mice used to derive the G₁ generation, all pairs produced at least one male and nine pairs produced at least one female, which could have been used for mating with the B10 mice. When more offspring were produced we selected individuals for experimental breeding arbitrarily. In total, we obtained 251 F₁ males in reciprocal crosses between G₁ *M. m. musculus* and B10 mice. Of these, 138 males were produced in crosses between B10 females and G₁ males from Studenec and 113 males were produced in the reciprocal cross. The proportion of sterile males (50.4%) was equal to that of fertile males in the G₁ × B10 progeny, but it was skewed towards fertile males in the B10 × G₁ progeny (37.7% sterile males). The proportion of sterile males in the whole dataset was 43.4%.

We did not find any predictable relationship between external morphological traits and the occurrence of sterility in the whole set of F₁ hybrids. Nom-

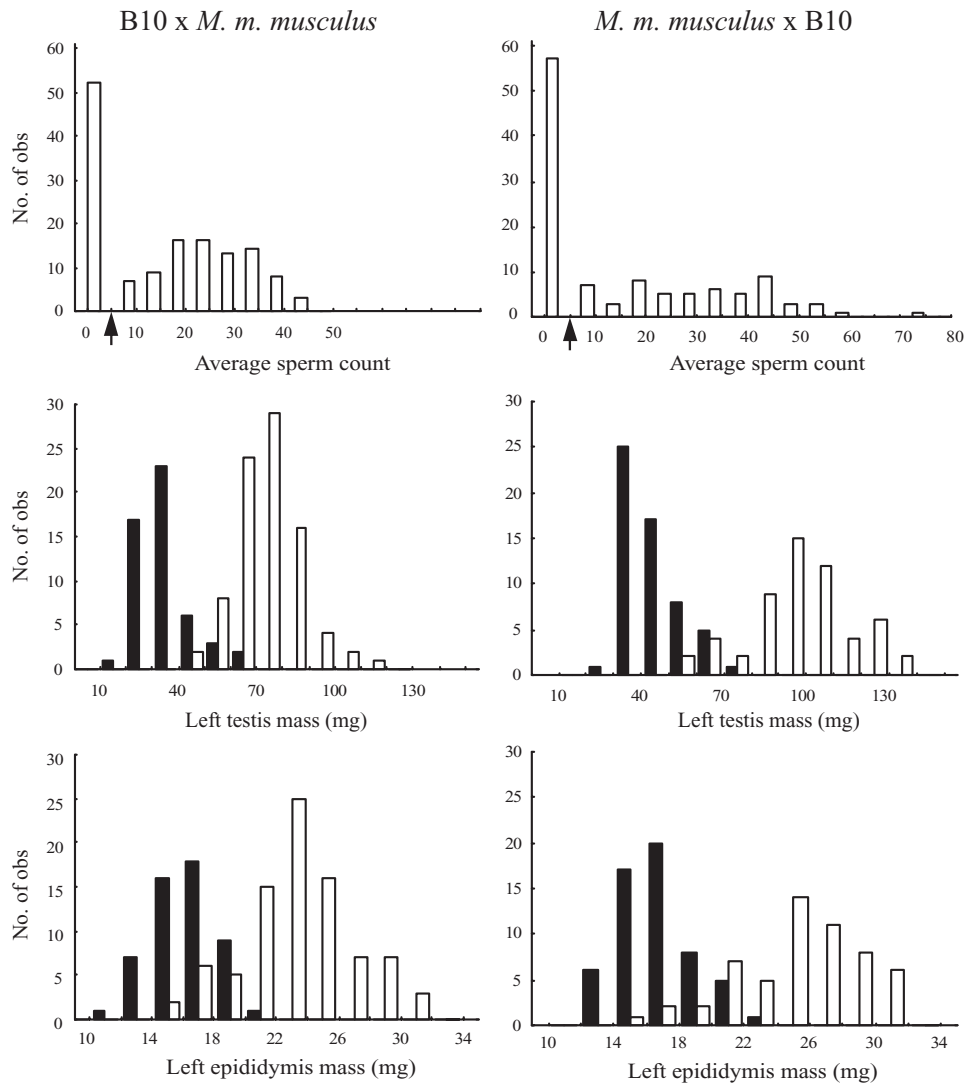


Figure 4. Distributions of average sperm counts, left testis mass and left epididymis mass plotted separately for both reciprocal crosses B10 \times *Mus musculus musculus* (left) and *M. m. musculus* \times B10 (right). Arrows in the average sperm count (ASC) distributions depict the borderline between sterility and fertility. Black bars in the remaining panels indicate the distributions of the organs measured among sterile males (ASC < 5) and white bars show distributions among fertile males (ASC \geq 5).

inal logistic regression (NLR) revealed that the presence of fertile and sterile males was distributed independent of body mass (2LL < 0.016, $P = 0.901$, $N = 251$) or body length (2LL = 0.139, $P = 0.71$, $N = 250$). The only external trait showing association with sterility/fertility was tail length (2LL = 6.216, $P = 0.013$, $N = 240$), with a negative relationship between fertility and tail length (slope = -0.084 , $P = 0.015$). However, when this trait was regressed on ASC, this relationship disappeared (linear regression,

$F_{1,238} = 3.79$, $P = 0.053$). On the other hand, the presence of fertile and sterile males was significantly dependent on testis mass (NLR, 2LL = 255.382, $P < 0.001$, $N = 251$) and epididymis mass (NLR, 2LL = 206.854, $P < 0.001$, $N = 251$).

Values of variables differing between sterile and fertile F_1 hybrids are presented in Table 1. There was a significant effect of reciprocity of mating on testis mass of sterile males ($t = 4.29$, $N = 109$, $P < 0.001$). Males from crosses of female *M. m. musculus* \times B10

Table 1. Results of phenotype scores summarized over G_0 females and reciprocal crosses

G_0 mice	G_1 mice	Sterile males			Fertile males				
		N	Left testis mass	Left epididymis	ASC	N	Left testis mass	Left epididymis	ASC
(B10 \times G_1) F_1 hybrid male progeny									
2802	3010	5	33.3 (4.1)	14.0 (1.5)	0.4 (0.6)	5	88.4 (12.5)	26.7 (3.7)	35.5 (4.6)
2803	3370	8	31.2 (8.5)	14.3 (1.6)	0.1 (0.1)	5	77.9 (5.3)	23.9 (1.5)	26.1 (8.0)
2809	2998	1	39.0	18.2	0.2	17	78.8 (7.9)	25.9 (2.9)	25.5 (5.0)
2810	3660	2	30.9 (4.1)	19.4 (1.6)	0	7	86.9 (13.9)	26.4 (2.2)	26.9 (9.4)
2813	3006	6	34.5 (6.1)	17.0 (1.8)	0.4 (0.5)	13	62.7 (12.0)	21.2 (2.8)	19.0 (5.7)
2814	4337	6	51.6 (7.1)	17.5 (1.1)	3.2 (1.0)	7	65.2 (8.1)	19.3 (3.2)	13.0 (7.7)
2818	3578	3	28.9 (4.8)	17.1 (1.3)	0.6 (0.7)	16	71.6 (7.2)	23.2 (3.3)	30.1 (8.5)
2819	4269	1	31.3	15.1	0	9	75.0 (7.7)	23.0 (3.2)	25.0 (6.9)
2821	3112	10	29.1 (2.7)	15.9 (1.4)	0	–			
	3507	7	29.0 (1.7)	16.7 (1.1)	0	–			
2826	3112	3	50.8 (11.0)	17.7 (1.1)	1.6 (1.7)	7	65.4 (7.1)	20.1 (2.2)	11.5 (4.7)
Mean		52	34.6 (9.9)	16.2 (2.0)	0.6 (1.2)	86	73.6 (12.3)	23.3 (3.7)	23.9 (9.5)
(G ₁ \times B10) F_1 hybrid male progeny									
2802	3220	5	38.3 (4.0)	16.9 (1.9)	0	2	57.8 (6.1)	23.5 (3.5)	6.5 (0.5)
	3221	–				7	116.6 (8.6)	28.4 (2.1)	27.6 (7.3)
	3222	4	51.4 (8.2)	16.9 (1.9)	1.8 (2.0)	3	90.5 (7.1)	26.5 (2.3)	30.7 (8.9)
2809	3001	4	47.5 (9.4)	17.2 (0.5)	0.1 (0.2)	2	87.8 (2.0)	24.6 (0.4)	20.3 (7.3)
	3148	1	42.4	15.7	0	1	88.8	22.0	33.0
	3353	–				4	110.2 (10.2)	29.0 (2.2)	47.1 (8.2)
2810	3413	–				1	131.7	30.4	73.4
2813	3436	–				2	75.4 (22.6)	21.0 (3.3)	20.6 (15.4)
	3437	–				2	108.1 (14.3)	26.0 (1.0)	43.2 (1.0)
	3438	–				3	94.6 (5.1)	25.4 (2.7)	47.1 (3.8)
	3668	1	55.9	17.9	0	1	114.1	28.3	39.6
2814	4700	–				1	125.6	28.5	41.2
	4701	1	50.5	28.5	0	–			
	4702	3	56.3 (6.8)	17.6 (1.7)	0.7 (1.0)	7	99.1 (7.7)	25.2 (2.2)	31.6 (12.8)
2818	3971	5	43.8 (0.5)	17.8 (1.6)	0.3 (0.5)	–			
	3972	–				2	86.3 (13.4)	26.3 (4.4)	36.9 (6.7)
2819	3100	–				2	76.2 (6.0)	24.4 (0.4)	13.1 (3.1)
	3295	2	53.2 (8.7)	20.2 (0.7)	1.4 (1.4)	4	80.6 (12.0)	21.2 (3.3)	17.0 (6.5)
	3740	–				2	98.6 (5.0)	23.7 (1.9)	14.8 (8.4)
	3741	1	68.5	21.0	0	1	113.9	31.2	52.0
	4014	–				1	97.7	27.6	30.2
	4015	1	37.7	17.9	0	2	92.8 (5.4)	26.0 (1.1)	41.0 (4.4)
2821	2987	8	32.0 (0.9)	14.6 (1.0)	0	–			
	3988	6	33.5 (3.0)	15.7 (0.8)	0	–			
	3114	1	31.5	16.4	0	–			
	3510	3	36.0 (3.3)	14.8 (2.2)	0	–			
2826	2995	3	41.7 (2.6)	16.6 (3.6)	0	–			
	3124	2	61.1 (15.4)	18.3 (2.6)	2.3 (2.3)	3	105.2 (7.6)	19.8 (4.2)	17.9 (4.4)
	3125	5	49.1 (12.0)	19.7 (1.9)	0.8 (0.9)	1	88.0	25.3	17.8
	3126	1	44.8	15.6	0	2	87.8 (18.2)	22.0 (1.2)	14.7 (9.5)
Mean		57	43.3 (11.3)	16.9 (2.3)	0.4 (1.1)	56	97.2 (18.3)	25.4 (3.7)	29.8 (15.3)

Average values for measured variables (plus standard deviations in parentheses) are averaged over males produced by individual G_1 females; means show averaged values over G_0 females. ASC, average sperm count.

males displayed larger testes (average left testis mass = 43.3 mg) compared with males from reciprocal crosses (average left testis mass = 34.6 mg). Sterile males had, on the other hand, the same mass of the left epididymis irrespective of cross reciprocity ($t = 1.72$, $N = 109$, $P < 0.088$; average mass = 16.6 mg).

We restricted the analysis of the effect of reciprocity in fertile males to families that produced more than five males in both types of cross. This restricted dataset included 111 males with 53 and 58 hybrid males from crosses $G_1 \times B10$ and $B10 \times G_1$, respectively. We found significant differences in testis mass ($t = 8.53$, $P < 0.001$; hybrid males from the $G_1 \times B10$ cross had an average mass of 97.0 mg, while those from $B10 \times G_1$ had an average mass of 72.2 mg), epididymis mass ($t = 3.11$, $P < 0.002$; hybrid males from $G_1 \times B10$ cross had an average mass of 25.2 mg, while those of $B10 \times G_1$ had an average mass of 23.0 mg), and ASC ($t = 3.14$, $P < 0.002$; hybrid males from $G_1 \times B10$ cross had on average 28.68 sperm, while those of $B10 \times G_1$ had on average 21.61 sperm).

The distributions of sperm count, epididymis and testis mass were bimodal in both types of cross (Fig. 4), the only exception being the distribution of ASC in the *M. m. musculus* \times B10 cross, in which the number of fertile males was rather uniform over the classes of sperm counts. The overlaps of values for sterile and fertile males were higher for left epididymis mass than they were for left testis mass.

MOLECULAR DATA

To assess the role of the *Hst1* gene in the sterility described in the previous section, a segregation analysis was performed using molecular markers on G_1 and F_1 mouse DNA. The results of the molecular analysis are summarized in Table 2. Three new markers were introduced to map genes from the *Hst1* region: CH07, M334 and Ph4. Two of them, CH07 and M334, as well as the already published marker DB3, were found to be highly polymorphic with up to six detectable alleles on the gel. The remaining three markers displayed only two different alleles. One of the *Hba-ps4* alleles was preferentially associated with the presence of *t* haplotypes. The remaining two markers, *D17Mit164* and Ph4, displayed one allele with the same length as the B10 allele and the second allele was found in some *M. m. musculus*.

For technical reasons, we could not score all offspring so we had to restrict our analysis to families in which sons possessed alleles differing substantially in length of the scored microsatellites. In total, we analysed 76 males representing nine segregating families. (Note that in Table 2 two families descended from a G_0 female 2821 were included; however, only sterile males were produced in these families. This reduced

the number of families suitable for mapping of sterility to seven.)

The *t*-haplotype associated allele at the *Hba-ps4* locus was detected in only two families. In one case it segregated with both sterile and fertile males (in the family derived from 3578 G_1 female). In the second case this allele was present in a fertile male. Thus, the presence of *t* haplotypes did not contribute to male sterility in this study and was excluded from further analysis.

Because of the close proximity of all molecular markers used here we assumed a priori that only two haplotypes would be found in segregating families. In fact, this assumption was confirmed in all nine families. No recombination was found among 76 males scored. We found 15 different haplotypes among the progeny and there were two different haplotypes in the family producing only sterile males.

Within each family, males were grouped according to either their inherited haplotype or fertility estimates based on sperm count. Sterility (in males with $ASC < 5$) was found to segregate with microsatellite markers in three of six families (females G_0 2802, 2809, 2813; 34 males in total). No such association could be revealed in three families (females G_0 2814, 2818, 2819; 27 males).

DISCUSSION

PHENOTYPIC DATA

Since the discovery of mouse hybrid male sterility in the 1960s (Iványi *et al.*, 1969; Forejt & Iványi, 1975) research has focused largely on mapping the *Hst1* gene (Forejt *et al.*, 1991; Trachtulec *et al.*, 1994, 1997, 2004; Gregorová *et al.*, 1996). This study extends the knowledge of hybrid sterility in a different way. By crossing wild *M. m. musculus*, sampled from a population geographically separated from that originally studied by Forejt & Iványi (1975), to B10 mice we have found that some phenotypic traits of F_1 males depend on the direction in which the parents are crossed. In addition, we have demonstrated that the production of sterile males associated with the *Hst1* gene is not a unique trait of Prague mice and that this phenomenon is more widespread in wild populations of *M. m. musculus*. It is worth mentioning here that the presence of male sterility has also been reported in one out of three males sampled in Denmark (Forejt & Iványi, 1975); unfortunately, no detailed information has been provided on the genetic basis underlying sterility in Danish males (but see Britton-Davidian *et al.*, 2005, this issue, for new data).

The phenotypic manifestation of sterility observed in this study closely resembles the pattern described earlier in crosses between wild *M. m. musculus* and

Table 2. The genotypes of *D17Mit164*, four markers characterized at the *Hst1* region (DB3, Ph4, CH07, M334), and *t* haplotype (*Hba-ps4*) of nine G₁ mice and 76 hybrid males with corresponding data for left testis mass and average sperm count (ASC)

G ₀ mice	G ₁ mice	F ₁ no.	Left testis mass	ASC	Markers						
					<i>Mit164</i>	DB3	Ph4	CH07	M334	<i>Hba</i>	
2802	3010	5	88.4 (12.5)	35.5 (4.6)	a/a	a/f	b/b	a/c	a/e	+/+	
			33.3 (4.1)	0.4 (0.6)	a	f	b	a	a	+/+	
		3222	5	33.3 (4.1)	0.4 (0.6)	a	a	b	c	e	+/+
			2	95.5 (0.1)	24.9 (4.5)	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	+/+
			4	51.4 (8.2)	1.8 (2.0)	a	b	a	b	a	+/+
2809	3001	2	87.8 (2.0)	20.3 (7.3)	a	b/c	a/a	b/f	a/e	+/+	
		4	47.5 (9.4)	0.1 (0.2)	a	a	a	b	b	+/+	
		2	87.8 (2.0)	20.3 (7.3)	a	b	a	f	a	+/+	
2813	3006	4	47.5 (9.4)	0.1 (0.2)	b	c	a	b	e	+/+	
		7	68.1 (10.2)	22.9 (3.0)	a/b	c/f	a/b	a/d	b/e	+/+	
		5	34.4 (6.1)	0.3 (0.4)	a	c	b	d	b	+/+	
2814	4702	3	102.9 (7.7)	35.3 (14.1)	b	d	a	a	e	+/+	
			4	96.3 (6.4)	28.9 (11.0)	a	c	a	b	e	+/+
		1	65.9	2.2	b	d	a	a	e	+/+	
			2	51.5 (1.1)	0 (0)	a	c	a	b	e	+/+
			2	51.5 (1.1)	0 (0)	a	c	a	b	e	+/+
2818	3578	10	70.3 (5.8)	30.9 (7.4)	a/a	c/e	b/b	c/d	c/d	+/t	
		2	30.3 (5.5)	0.8 (0.8)	a	e	b	c	c	+/+	
		1	26.2	0.2	a	c	b	d	d	+/t	
2819	3295	1	98.6	27.2	a/a	b/d	a/b	b/e	d/e	+/t	
			2	69.7 (0.2)	12.8 (3.6)	a	b	b	e	d	+/t
		1	44.4	0	a	d	a	b	e	+/+	
2821	3112	5	30.9 (2.0)	0 (0)	a/a	b/c	a/b	b/c	a/e	+/+	
			4	27.4 (2.3)	0 (0)	a	c	a	b	e	+/+
		3507	3	29.8 (1.2)	0 (0)	a	b	b	c	a	+/+
			3	29.8 (1.2)	0 (0)	a/a	b/c	a/b	b/c	a/e	+/+
			3	28.0 (1.9)	0 (0)	a	c	a	b	e	+/+

Allele b is identical with the B10 allele. In the notation of genotypes of F₁ hybrids, the B10 alleles were removed for simplicity from the first five markers. Relative sizes of alleles are for *D17Mit164*: b = B10 > a; DB3: d > c > a > f > b = B10 > e; Ph4: a > b = B10; CH07: d > e > b = B10 > f > a > c; M334: e > c > a > b = B10 > d.

B10 mice (Forejt & Iványi, 1975), in that sterile males had low testis mass and the frequency of sterile males was not correlated with body mass. In addition to these findings, we have shown for the first time that sterile males have significantly lower epididymis mass when compared with fertile males.

Because only wild *M. m. musculus* males were used in the original study by Forejt & Iványi (1975), describing hybrid sterility, we designed experiments to test for differences in reciprocal crosses. The results confirmed that the occurrence of sterility in hybrid males is independent of the direction of the cross (Figs 3, 4). However, we found statistically significant

effects of reciprocity in ASC, testis and epididymis mass in fertile males (Table 1). The differences were consistent: males from the G₁ × B10 cross were shown to surpass those from the reciprocal cross in all measured traits. Unfortunately, the scarcity of similar data in the literature prevents us from generalizing our results. Only one of the traits studied here has been analysed and discussed as a criterion of sterility (Forejt & Iványi, 1975). These authors found that in crosses between (B10 × C3H)F₁ × W the mass of paired testes was lower than 90 mg in sterile males, while it was higher in fertile males. They also found a bimodal distribution of testes mass with a gap

between classes of sterile and fertile males in B10 × W crosses. While, on average, our results matched theirs for both types of cross (nearly 70 mg for paired mass of testes in B10 × G₁ and 87 mg in G₁ × B10), we found that limiting values of paired testis mass for sterile males can, especially in the G₁ × B10 crosses, exceed those reported by Forejt & Iványi (1975). The maximum value of paired testis mass in a sterile male was 137 mg (Table 1, G₁ × B10 cross, a descendant of the 2819 G₀ female). Differences in the distribution of testis mass also depended on the direction of the cross: this distribution was clearly bimodal in the B10 × G₁ progeny but rather uniform in the G₁ × B10 progeny (Fig. 4), with higher variation of ASC in the G₁ × B10 males. Unfortunately, we are unable to propose any reason that might explain this pattern of distribution.

We also observed an unequal proportion of sterile males in reciprocal crosses in our data. The most plausible explanation for this inequality is that it resulted from the experimental design adopted in this study: we crossed one G₁ male with four genetically uniform B10 females, but one B10 male with four genetically heterogeneous G₁ females. This design introduced higher variability in the latter case and is documented in Figure 3.

Despite the paucity of comparable data, two general conclusions based on these results can be drawn. First, the overlap of bimodally distributed variables is more restricted in testis mass than it is in epididymis mass. Although we found significant relationships between these two variables and sterility, the more pronounced bimodality in histograms of testis mass supports the finding that this parameter is a reliable predictor of hybrid male sterility. Second, we have shown that the phenotype associated with hybrid sterility is dependent on the direction of crosses. Hence, the limiting value of any parameter used to distinguish fertile and sterile males, such as testis mass, can vary and must be estimated for both types of cross.

MOLECULAR DATA

Male sterility has been associated with *t* haplotypes in numerous variants in *Mus* (Bennett, 1975). The presence of *t* haplotypes in our study was determined using the *Hba-ps4* molecular marker whose reliability has been proven recently in numerous pure and hybrid populations of wild mice (Dod *et al.*, 2003). Our results allowed us to exclude unequivocally the possibility that the sterility is confounded by the presence of the sterility factors in the *t* haplotype of *M. musculus* origin and its interaction with the B10 genome.

The high level of allelic diversity revealed in this study at three microsatellite markers in the *Hst1* region provided a solid tool for haplotype analysis of

sterility gene(s) presumably located in this region. The results of these molecular analyses indicate that hybrid male sterility is, at least in three out of seven families, associated with a gene or genes in the *Hst1* region. Surprisingly, in three families, fertility of males did not segregate with the *Hst1* region; although the low number of males analysed in one family (2819 G₀ female, Table 2) prevents us from drawing strong conclusions, data for the other two families (2814 and 2818 G₀ females, Table 2) suggest that the breakdown of spermatogenesis in these two families is not associated with a gene or genes located in the *Hst1* region. This finding suggests that these two families possess allelic variation at different loci underlying hybrid sterility and stresses the need for studying geographical variation and genetic complexity of hybrid sterility. Recently, two independent papers reported the presence of male sterility caused exclusively by genes located on the X chromosome (Oka *et al.*, 2004; Storchová *et al.*, 2004). In these two studies, sterile males were observed in the chromosome substitution strain C57Bl6-X^{MSM}, in which the X chromosome of the C57Bl6 strain was substituted by the X chromosome of the MSM strain derived from *M. m. molossinus* (Oka *et al.*, 2004), or in the C57Bl6-X^{PWD} strain, in which the X chromosome was derived from the PWD strain representing *M. m. musculus* (Storchová *et al.*, 2004).

Finally, one family produced only sterile males. We are currently generating two wild-derived lines of *M. m. musculus*: one producing only fertile males when crossed to B10 mice, the second producing only sterile males (J. Piálek, unpubl. data). Backcrosses ((sterile line × fertile line) × B10) should facilitate genetic mapping and confirm whether male sterility in this family is associated with the *Hst1* region or with the newly described genetic system. The discovery of two different *Hst1* haplotypes in the family descending from G₀ female 2821 producing only sterile males indicates possible problems in searching for sterility-specific haplotypes in populations of *M. m. musculus*. It appears that recombination and/or microsatellite expansion has removed the association between marker alleles and the gene causing hybrid sterility observed in this study.

Summarizing the results of our phenotypic and molecular analyses, the most plausible explanation for our observations is that at least two genes polymorphic in wild *M. m. musculus* sampled in Studenec contribute to hybrid male sterility. Their phenotypic expression is significantly different between reciprocal crosses. Both the Prague and Studenec populations were found to be polymorphic for genes underlying sterility, and these independent observations might indicate a recent origin of genes causing spermatogenic breakdown.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAA6093201) and Grant Agency of the Czech Republic 204/98/KO15. Pavel Munclinger is acknowledged for designing primers Ph4IN from the *D17Ph4e* gene. We thank Dana Havełková, Lída Malá and Jana Piálková for keeping mice and Jan Zima for keeping M.V. and J.P. in Studenec. Miloš Macholán, Michael Nachman, Kate Teeter, Janice Britton-Davidian and two anonymous reviewers greatly improved an earlier version of this paper.

REFERENCES

- Bennett D. 1975.** The T-locus of the mouse. *Cell* **6**: 441–454.
- Bishop CE, Boursot P, Baron B, Bonhomme F, Hatat D. 1985.** Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* **315**: 70–72.
- Boissinot S, Boursot P. 1997.** Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome? *Genetics* **146**: 1019–1034.
- Bonhomme F, Guénet J-L, Dod B, Moriwaki K, Bulfield G. 1987.** The polyphyletic origin of laboratory inbred mice and their rate of evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* **30**: 51–58.
- Boursot P, Auffray J-C, Britton-Davidian J, Bonhomme F. 1993.** The evolution of house mice. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 119–152.
- Boursot P, Din W, Anand R, Darviche D, Dod B, Deimling FV, Talwar GP, Bonhomme F. 1996.** Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 391–415.
- Božíková E, Munclinger P, Teeter KC, Tucker PK, Macholán M, Piálek 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**: 363–378.
- Britton-Davidian J, Fel-Clair F, Lopez J, Alibert P, Boursot P. 2005.** Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: estimates from fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 379–393.
- Coyne JA, Orr HA. 1998.** The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **353**: 287–305.
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant M, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, Evans CA, DeAngelis MM, Levinson DM, Kruglyak L, Goodman N, Copeland NG, Jenkins NA, Hawkins TL, Stein L, Page DC, Lander ES. 1996.** A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149–152.
- Dod B, Litel C, Makoundou P, Orth A, Boursot P. 2003.** Identification and characterization of *t* haplotypes in wild mice populations using molecular markers. *Genetical Research* **81**: 103–114.
- Dod B, Smadja C, Karn RC, Boursot P. 2005.** Testing for selection on the androgen-binding protein in the Danish mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 447–459.
- Forejt J. 1981.** Hybrid sterility gene located in the *T/t-H-2* supergene on chromosome 17. In: Reisfeld RS, Ferrone RA, eds. *Current trends in histocompatibility*. New York: Plenum Press, 101–131.
- Forejt J. 1985.** Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Experimental and Clinical Immunogenetics* **2**: 106–119.
- Forejt J. 1996.** Hybrid sterility in the mouse. *Trends in Genetics* **12**: 412–417.
- Forejt J, Iványi P. 1975.** Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genetical Research* **24**: 189–206.
- Forejt J, Vincek V, Klein J, Lehrach H, Loudová-Micková M. 1991.** Genetic mapping of the *t*-complex region on mouse chromosome 17 including the *Hybrid sterility-1* gene. *Mammalian Genome* **1**: 84–91.
- Gregorová S, Forejt J. 2000.** PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies – a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biologica* **46**: 31–41.
- Gregorová S, Mňuková-Fajdelová M, Trachtulec Z, Čapková J, Loudová M, Hoglund M, Hamvas RMJ, Lehrach H, Vincek V, Klein J, Forejt J. 1996.** Sub-milli-Morgan map of the proximal part of mouse chromosome 17 including the *hybrid sterility 1* gene. *Mammalian Genome* **7**: 107–113.
- Guénet J-L, Nagamine CM, Simon-Chazottes D, Montagutelli X, Bonhomme F. 1990.** *Hst-3*: an X-linked hybrid sterility gene. *Genetical Research* **56**: 163–165.
- Haldane JBS. 1922.** Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* **12**: 101–109.
- Hoelzel AR. 1992.** *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Howard DJ, Marshall JL, Hampton DD, Britch SC, Draney ML, Chu JM, Cantrell RG. 2002.** The genetics of reproductive isolation: a retrospective and prospective look with comments on ground crickets. *American Naturalist* **159**: S8–S21.
- Iványi P, Vojtšíšková M, Démant P, Micková M. 1969.** Genetic factors in the ninth linkage group influencing reproductive performance in male mice. *Folia Biologica* **15**: 401–421.
- Macholán M, Kryštufek B, Vohralík V. 2003.** The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriologica* **48**: 177–188.
- Munclinger P, Boursot P, Dod B. 2003.** B1 insertions as easy markers for mouse population studies. *Mammalian Genome* **14**: 359–366.
- Munclinger P, Božíková E, Šugerková M, Piálek J, Macholán M. 2002.** Genetic variation in house mice (*Mus*, Muridae, Rodentia) from the Czech and Slovak Republics. *Folia Zoologica* **51**: 81–92.

- Nagamine CM, Nishioka Y, Moriwaki K, Boursot P, Bonhomme F, Lau YFC. 1992. The *musculus*-type Y chromosome of the laboratory mouse is of Asian origin. *Mammalian Genome* **3**: 84–91.
- Oka A, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Takagi N, Takano-Shimizu T, Toshimori K, Moriwaki K, Shiroishi T. 2004. Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics* **166**: 913–924.
- Orth A, Belkhir K, Britton-Davidian J, Boursot P, Benazou T, Bonhomme F. 2002. Natural hybridisation between two sympatric species of mice *Mus musculus domesticus* L. & *Mus spretus* Lataste. *Comptes Rendus Biologies* **325**: 89–97.
- Pilder SH. 1997. Identification and linkage mapping of *Hst7*, a new *M. spretus*/*M. m. domesticus* chromosome 17 hybrid sterility locus. *Mammalian Genome* **8**: 290–291.
- Pilder SH, Hammer M, Silver LM. 1991. A novel mouse chromosome 17 hybrid sterility locus: implications for the origin of *t* haplotypes. *Genetics* **129**: 237–246.
- Pilder SH, Olds-Clarke P, Phillips DM, Silver LM. 1993. *Hybrid sterility-6*: a mouse *t* complex locus controlling sperm flagellar assembly and movement. *Developmental Biology* **159**: 631–642.
- Raufaste N, Orth A, Belkhir K, Senet D, Smadja C, Baird SJE, Bonhomme F, Dod B, Boursot P. 2005. Inferences of selection and migration in the Danish house mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 593–616.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 365–386.
- Sage RD, Atchley WR, Capanna E. 1993. House mice as models in systematic biology. *Systematic Biology* **42**: 523–561.
- SAS Institute Inc. 2002. *JMP. The statistical discovery software*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schimenti J, Hammer M. 1990. Rapid identification of mouse *t* haplotypes by PCR polymorphism (PCRP). *Mouse Genome* **87**: 108.
- Searle AG, Beechey CV. 1974. Sperm count, egg fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutation Research* **22**: 63–72.
- Silver LM. 1985. Mouse *t* haplotypes. *Annual Review of Genetics* **19**: 179–208.
- Storchová R, Gregorová S, Buckiová D, Kyselová V, Divina P, Forejt J. 2004. Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome* **15**: 515–524.
- Trachtulec Z, Mihola O, Vlcek C, Himmelbauer H, Pačes V, Forejt J. 2005. Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 637–641.
- Trachtulec Z, Mňuková-Fajdelová M, Hamvas RMJ, Gregorová S, Mayer WE, Lehrach HR, Forejt J, Klein J. 1997. Isolation of candidate *Hybrid sterility 1* genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mammalian Genome* **8**: 312–316.
- Trachtulec Z, Vincek V, Hamvas RMJ, Forejt J, Lehrach H, Klein J. 1994. Physical map of mouse chromosome 17 in the region relevant for positional cloning of the *Hybrid sterility 1* gene. *Genomics* **23**: 132–137.
- Wade CM, Kulbokas EJ, Kirby AW, Zody MC, Mullikin JC, Lander ES, Lindblad-Toh K, Daly MJ. 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**: 574–578.
- Yoshiki A, Moriwaki K, Sakakura T, Kusakabe M. 1993. Histological studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mouse strain. *Development, Growth and Differentiation* **35**: 271–281.

Článek B

Development of Unique House Mouse Resources Suitable for Evolutionary Studies of Speciation

Journal of Heredity 99: 34-44 (2008)

PIÁLEK, J., VYSKOČILOVÁ, M., BÍMOVÁ, B., HAVELKOVÁ, D., PIÁLKOVÁ, J., DUFKOVÁ, P.,
BENCOVÁ, V., ĎUREJE, Ľ, ALBRECHT, T., HAUFFE, H. C., MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P.,
STORCHOVÁ, R., ZAJICOVÁ, A., HOLÁŇ, V., GREGOROVÁ, S. & FOREJT, J.

Pro tuto práci jsem charakterizovala nově vytvořené linie pomocí mikrosatelitových markerů a podílela se na psaní odpovídající části publikace.

Development of Unique House Mouse Resources Suitable for Evolutionary Studies of Speciation

JAROSLAV PIÁLEK, MARTINA VYSKOČILOVÁ, BARBORA BÍMOVÁ, DANA HAVELKOVÁ, JANA PIÁLKOVÁ, PETRA DUFKOVÁ, VĚRA BENCOVÁ, L'UDOVÍT ĎUREJE, TOMÁŠ ALBRECHT, HEIDI C. HAUFFE, MILOŠ MACHOLÁN, PAVEL MUNCLINGER, RADKA STORCHOVÁ, ALENA ZAJÍCOVÁ, VLADIMÍR HOLÁŇ, SOŇA GREGOROVÁ, AND JIŘÍ FOREJT

From the Department of Population Biology, Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, CZ-675 02 Studenec 122, Czech Republic (Piálek, Vyskočilová, Bímová, Havelková, Piálková, Dufková, Bencová, Ďureje, Albrecht, and Hauffe); the Department of Biology, University of York, United Kingdom (Hauffe); the Laboratory of Mammalian Evolutionary Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic (Macholán and Munclinger); the Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic (Albrecht, Munclinger, and Storchová); and the Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic (Storchová, Zajícová, Holáň, Gregorová, and Forejt).

Address correspondence to J. Piálek at the address above, or e-mail: jpialek@brno.cas.cz.

Abstract

Two house mouse subspecies, *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus*, form a hybrid zone in Europe and represent a suitable model for inferring the genes contributing to isolation barriers between parental taxa. Despite long-term intensive studies of this hybrid zone, we still know relatively little about the causes and mechanisms maintaining the 2 taxa as separate subspecies; therefore, to gain insight into this process, we developed 8 wild-derived inbred house mouse strains. In order to produce strains as pure *domesticus* or *musculus* genomes as possible, the individuals used to establish the breeding colony for the 3 *domesticus* and 2 of the *musculus* strains were captured in the Czech Republic from wild populations at extreme western and eastern edges of the subspecific contact zone, respectively. The remaining 3 *musculus* strains were bred from mice captured about 250 km east of the hybrid zone. Genetic analysis based on 361 microsatellite loci showed that 82% of these markers are diagnostic for either the *musculus* or the *domesticus* strains. In order to demonstrate the potential utility of this genetic differentiation in such strains, phenotypic variation was scored for 2 strains from opposite edges of the hybrid zone and significant differences in morphology, reproductive performance, in vitro immune responses, mate choice based on urinary signals, and aggressiveness were found. In addition, the 3 strains derived from *musculus* populations far from the hybrid zone display significant differences in polymorphism in hybrid male sterility when crossed with the laboratory strains C57BL/6 or C57BL/10, which have a predominantly *domesticus* genome. Although further studies will be necessary to demonstrate intersubspecific differences, all analyses presented here indicate that these newly developed house mouse strains represent a powerful tool for elucidating the genetic basis of isolation barriers in hybrid zones and for studying speciation in general.

One of the central tenets of evolutionary biology lies in the description and understanding of the barriers preventing gene flow between 2 incipient species. A model organism highly suitable for this purpose is the house mouse, *Mus musculus*. Its 2 subspecies, *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus* interbreed under natural conditions and in Europe form a narrow hybrid zone about 2500 km long stretching from the Jutland Peninsula in Denmark to the

Black Sea in Bulgaria (Macholán et al. 2003). Two basic strategies can be used to study speciation in these wild populations. The first approach is to study free-living mice in those geographic regions where these 2 subspecies meet and hybridize: by estimating the strength of selection acting on a set of markers differing between the parental populations, it is possible to identify some of the genomic regions that contribute to the creation of barriers to gene

flow and, hence, may harbor the genes responsible for speciation (Payseur et al. 2004; Dod et al. 2005; Payseur and Nachman 2005; Raufaste et al. 2005; but see Macholán et al. 2007). Unfortunately, high levels of genetic polymorphism in natural populations means that this approach is extremely costly and time consuming because it requires the identification of a large number of diagnostic markers, that is, those with different alleles fixed in each parental taxa. Alternatively, we propose that inbred strains specifically selected for certain traits useful for studying speciation and with reduced overall genetic variation could be used to perform between-strain crosses and backcrosses, so that genetic incompatibilities that potentially hamper gene flow and preventing intermixing of the 2 parental genomes could be detected. Comparing the results from these 2 approaches could prove decisive in the understanding of the evolutionary processes driving speciation.

Nearly 450 laboratory strains of the house mouse and their variants have already been characterized and listed (Festing 1996). However, although these variants have proved to be of critical importance for the understanding of many biological processes (Davisson and Linder 2004), existing laboratory mouse strains are not particularly useful for mapping speciation genes. First, most "classical" mouse strains represent a mixture of various mouse genomes (Wade et al. 2002; Frazer et al. 2004; Wade and Daly 2005), and the assignment of different parts of a particular mouse strain genome to either the *musculus* or the *domesticus* subspecies cannot be ascertained without identification of the ancestral polymorphisms present before lineage splitting and the mutations induced during long-term inbreeding. Second, despite the high number of variants, the majority is descended from a limited number of mouse strains and represents mutant types of a spontaneous or induced origin. Instead, the selection of house mouse strains from wild individuals reduces natural genetic variation to a 1-allele state at many loci for each strain and this interstrain genetic variation can be easily detected and assigned to either the *M. m. domesticus* or the *M. m. musculus* genome. Finally, mouse stocks inbred for at least ~20 generations also display more uniform phenotypic traits. This fact facilitates the definition of phenotypic classes and the detection of associations between genotypes and phenotypes using quantitative trait loci (QTLs) mapping.

In the present paper, we describe the development of 8 wild-derived house mouse strains with genetic and phenotypic differences for inferring the evolutionary processes occurring in situ in this hybrid zone and to elucidate the genetic basis of hybrid sterility and speciation genes in general. We conclude that both genetic and phenotype traits differ among strains and genomes and are potentially suitable for genetic dissection in QTL studies.

Materials and Methods

Source Populations of House Mouse Strains

The founders of all inbred strains were captured from wild populations of the house mouse in the Czech Republic and

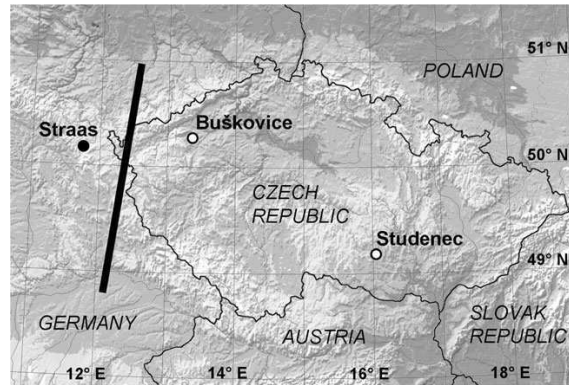


Figure 1. Localities where wild mice were collected (founders of inbred strains described in this paper): open circles, *musculus* populations; closed circle, *domesticus* population; and black line, position of the center of the hybrid zone between *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus* in this area. The map was created using Microsoft Encarta Premium Suite (2003).

Germany (Figure 1). Five of these strains were developed from individuals considered to have pure *M. m. musculus* genomes and 3 from individuals with a *M. m. domesticus* genome. Three inbred lines selected for alternative phenotypes regarding sterility, when mated with the laboratory mice of C57BL/6 or C57BL/10 (see details in Results), were derived from wild *M. m. musculus* caught in November 2000 in the village of Studenec, Moravia, Czech Republic (Figure 1 and Table 1), which is 250 km east of the *musculus*–*domesticus* hybrid zone (populations in this area are considered to be pure *musculus* mice [Munclinger et al. 2002; Božíková et al. 2005]). The founders of the 3 *domesticus* and 2 other *musculus* strains were captured at the extreme western and eastern edges of the contact zone between the mouse subspecies about 50 km on either side of the hybrid zone center in villages of Straas and Buškovice, respectively (Figure 1; Munclinger et al. 2002; Macholán et al. 2007). Previous statistical analyses have indicated that the width of the multilocus autosomal and the compound X chromosome cline is about 9.6 km and 4.6 km, respectively, giving the estimate of the strength of the central barrier as about 20 km (Macholán et al. 2007). This estimate suggests that very few alleles will be able to cross and penetrate the contact zone for more than a few kilometers. Some introgression of the *musculus* and *domesticus* genomes might be expected in these 2 source villages due to their position on either side of the hybrid zone; however, because they are 50 km from the center of the zone, we expect that the proportion of introgressed alleles will be very low and these populations can be considered "pure." However, detailed genetic analyses of the 3 source populations are presented here in order to confirm this assumption (see Genetic Analyses below).

Table 1. Origin of wild-derived strains maintained in the Department of Population Biology, Studenec, Czech Republic

Subspecies	Strain	Dam	Sire	Date of capture	Locality ^a	Country ^b	Latitude (N)	Longitude (E)	Generation as of 31 December 2006 ^c
<i>musculus</i>	STUF	JPC 2802	JPC 2804	5 November 2000	Studenec	CZ	49°12'	16°04'	F ₂₃
<i>musculus</i>	STUP	JPC 2814	JPC 2824	5 November 2000	Studenec	CZ	49°12'	16°04'	F ₂₆
<i>musculus</i>	STUS	JPC 2821	JPC 2822	6 November 2000	Studenec	CZ	49°12'	16°04'	F ₁₇
<i>musculus</i>	BUSNA	JPC 2847	JPC 2851	21 November 2000	Buškovice	CZ	50°14'	13°22'	F ₂₃
<i>musculus</i>	BULS	JPC 2856	JPC 2852	21 November 2000	Buškovice	CZ	50°13'	13°23'	F ₁₉
<i>domesticus</i>	STRA	JPC 2705	JPC 2711	27 September 2000	Straas	D	50°11'	11°46'	F ₂₀
<i>domesticus</i>		JPC 2706	JPC 2713	27 September 2000	Straas	D	50°11'	11°46'	—
<i>domesticus</i>	STRB	JPC 2790 F ₁	JPC 2721	12 January 2001	Straas	D	50°11'	11°46'	F ₁₇
<i>domesticus</i>	STLT	JPC 2788 F ₁	JPC 2716	12 January 2001	Straas	D	50°11'	11°46'	F ₁₉

^a see Figure 1^b CZ = Czech Republic; D = Germany^c F_x indicates the xth generation of offspring born in captivity.

Housing and Breeding of Animals

The inbred strains are presently maintained at the Department of Population Biology, Studenec, Czech Republic. Ten wild parental pairs per sample population from Buškovice (*musculus*) and Studenec (*musculus*) and 3 parental pairs from Straas (*domesticus*) were used to set up the breeding colony founded at this facility. Based on reproductive performance, the *musculus* samples were reduced to 3 lines per population at the 10th generation born in captivity (F₁₀). In general, each generation was derived from 1 of 3 pairs of mice kept per line. The young were weaned at 20 days of age and bred in brother–sister pairs. All individuals were kept in Perspex cages at 20–22 °C on a 14/10-h light/dark cycle. Pelleted food (ST1, VELAZ, Prague, Czech Republic) and water were available *ad libitum*.

The breeding facility in Studenec has been licensed for keeping small mammals according to Czech law since 2000. Mice are kept in an open breeding system without barriers. All animal experiments followed protocols approved by Institutional and National Committees for Animal Welfare.

Genetic Analyses

Genomic DNA was extracted from individuals using DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from ethanol-preserved spleen tissue. Wild mice were assigned either to the *domesticus* or to the *musculus* subspecies using 1 extranuclear, 3 sex-linked, and 7 autosomal markers known a priori to be diagnostic for both house mouse subspecies: 1) the presence (*domesticus*)/absence (*musculus*) of the *Bam*HI restriction site in the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-1 (*mtNdt*) gene of the mitochondrial DNA (Boursot et al. 1996; Munclinger et al. 2002; Božiková et al. 2005); 2) the presence (*musculus*)/absence (*domesticus*) of a deletion located within the zinc finger protein 2 (*Zfy2*) gene on the Y chromosome (Nagamine et al. 1992; Orth et al. 1996); 3) and 4) the presence (*domesticus*)/absence (*musculus*) of the B1 insertions in the Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (*Btk*) and testis-specific (*Tcx*) genes

on the X chromosome (Munclinger et al. 2002, 2003); 5) the presence/absence of polymerase chain reaction (PCR) products using subspecies-specific primers within the androgen-binding protein alpha (*Abpa*) gene on chromosome 7 (Dod et al. 2005); and 6–11) the differences in electrophoretic mobility at 6 neutral or nearly neutral allozyme loci: isocitrate dehydrogenase-1 (*Idh1*, chromosome 1), glucose dehydrogenase-1 (*Gpd1*, chromosome 4), esterase-1 (*Est1*, chromosome 8), mannose phosphate isomerase (*Mpi*, chromosome 9), nucleoside phosphorylase (*Np*, chromosome 14), and superoxide dismutase-1 (*Sod1*, chromosome 16) following the protocols by Bonhomme et al. (1984) and Munclinger et al. (2002).

A genome-wide screen using 485 simple sequence length polymorphisms (SSLPs or microsatellites) was used to estimate the genetic polymorphism preserved in inbred mice. The SSLP loci represent a panel of markers preselected to cover polymorphism between the *domesticus* C57BL/6J strain and the *musculus*-derived PWD strain (Gregorová and Forejt 2000) and are evenly distributed across all autosomes and the X chromosome (Dietrich et al. 1996). One female from each strain was scored at generation ranging from F₁₅ (STUS from Studenec; Table 1) to F₂₅ (STUP, Studenec; Table 1). One male per strain at the same generation as its female counterpart was scored for one locus located on the Y chromosome, the *Zfy2* intron microsatellite (Boissinot and Boursot 1997). In order to compare the extent of polymorphism of SSLP markers in the new inbred strains developed in this study with similar mouse strains, one male and one female each from the PWD strain derived from wild, pure *M. m. musculus* mice (Gregorová and Forejt 2000) and 3 classical laboratory inbred strains: A/J, C3H/HeJ, and C57BL/6 obtained from a local provider (VELAZ) were also scored.

The majority of SSLPs (450 out of 475 markers) were scored from PCR products on agarose gels. PCRs were performed on a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a 10- μ l reaction volume containing 10 mM Tris–HCl (pH 8.5), 50 mM NH₄(SO₄)₂, 2 mM

MgCl₂ (Fermentas, Burlington, Canada), 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Fermentas), 0.33 μM of each unlabeled primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 unit of *Taq* polymerase (Fermentas), deionized water, and 30 ng genomic DNA. Each PCR was initiated with an activation step at 94 °C for 2 min, followed by 39 cycles of denaturation at 94 °C for 40 s, annealing at 55 °C for 40 s, and extension at 72 °C for 60 s, with a final extension of 60 °C for 5 min. Electrophoresis was carried out on 4% agarose gels containing ethidium bromide (10 μg per 10 ml of gel) in tris-borate-eda buffer.

Twenty-five SSLP markers were analyzed using fragment analysis. One of the 2 primers of each locus was 5'-end labeled with a fluorescent dye HEX, 6FAM, VIC, PET, or NED (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the loci were amplified in 6 different multiplex PCRs. For each individual and each of the 6 multiplex reactions, PCRs were performed on a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) in a total volume of 10 μl using the Qiagen Multiplex PCR Kit following the manufacturer's protocol and 30 cycles with an annealing temperature of 55 °C for 90 s. The 0.8 μl of PCR products were mixed with 0.25 μl of 500LIZ or 400ROX Size Standard (Applied Biosystems) and 12 μl of formamide (Applied Biosystems) and separated using an ABI PRISM 3130 sequencer (Applied Biosystems). Genotypes were scored using GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

Phenotype Scores

Immediately after cervical dislocation, for each genetically analyzed individual, body mass and body and tail length were measured. For each male, the onset of maturity (defined as age in days of males with the first occurrence of sperm in their epididymis), sperm count in adult individuals (mean sperm count more than 10 cells of the Bürker hematocytometer in the left epididymis of males aged more than 60 days), mass of left and right testis, and mass of left epididymis were recorded. The breeding performance of each strain was estimated from litter sizes averaged from the previous 6 captive generations.

Behavioral Analyses

In order to demonstrate the utility of the genetic differentiation selected for in our strains, sexual preferences of 60-day-old males and females from F₁₅ of 2 of the strains BULS (*musculus* derived) and STRA (*domesticus* derived; Table 1) were scored in a simple 2-way choice system with pools of homosubspecific and heterosubspecific urine (for details, see Bimová et al. 2005). To minimize the role of inbreeding avoidance that might lead to preferences to more different odor (the heterosubspecific one in our case) (Penn 2002), we used urine from strains BUSNA (*musculus* derived) and STLT (*domesticus* derived; Table 1) as signals. Tested animals (20 females and 20 males each from BULS and STRA) were bred in standard conditions as described above. Males were housed individually for at least 5 days before testing, and females were housed with a female littermate. Homosubspecific

preference was estimated as the coefficient of preference R_{signal} calculated from the time spent by sniffing both signals as follows:

$$R_{\text{signal}} = (\text{Time sniffing homosubspecific} - \text{heterosubspecific signal}) / (\text{Time sniffing homosubspecific} + \text{heterosubspecific signal}).$$

The sign of the coefficient indicates the direction of the preference with positive values indicating homosubspecific preferences. A Student's *t*-test was applied to analyze the deviation of R_{signal} from zero within each strain ($H_0: \mu = 0$), and analysis of variance (ANOVA) was used to test the difference between strains.

Aggressive behavior was studied in 20 F₁₃₋₁₄ males from each of the 2 strains BULS and STRA (Table 1) following Roubertoux et al. (2005). Each male, housed alone for 5 days preceding the first experiment, was tested repeatedly in 2 experimental dyadic encounters either against a *musculus* or against a *domesticus* male from the same strains. Each dyad consisted of 2 tests with opponents from the same strain: first, the neutral cage arena test and 10 days later followed by the resident-intruder test. The dyads were separated by 30-day pause, and the order of dyads (the origin of the first opponent) was random. Each male was thus tested 4 times against 4 different males at the age of 70, 80, 110, and 120 days. The result of each encounter was classified into 3 categories: winner (the tested male won the encounter), no fight (no aggressive interaction during the 6-min encounter), and loser (the tested male lost the encounter). The χ^2 statistics was applied to identify behavioral differences between the strains, and the significance level was adjusted with a Bonferroni correction.

Immunological Measures

In order to further demonstrate the genetic variation represented by these strains, 5 males and 5 females from F₁₄₋₁₅ of each of the 2 strains BULS and STRA (Table 1) were used to detect in vitro immunoresponsiveness against 2 antigens: T-cell mitogen Concanavaline A (ConA, Sigma, St. Louis, MO) and B-cell mitogen bacterial lipopolysaccharide (LPS, Difco Laboratories, Detroit, MI). Spleen cell suspensions and macrophages obtained by washing the peritoneal cavity of individual mice were cultivated and measured for 3 types of response: 1) cell proliferation after stimulation with 0.37 or 1.50 μg/ml of ConA and LPS; 2) cytokine production of interleukins IL-2, IL-4, IL-10, or interferon- γ (IFN- γ) in splenic cells and interleukins IL-6, IL-10, or IL-1 β in macrophages; and 3) production of nitric oxide (NO) in macrophages. The presence of cytokines in supernatants was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay using sets of cytokine-specific capture and detection monoclonal antibodies purchased from PharMingen (San Diego, CA), as previously described by Holáň et al. (1996). Nitrite concentrations in the supernatants were measured using the Griess reaction (Green et al. 1982) and quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium

Table 2. Frequencies of *musculus* alleles at diagnostic loci in wild populations from which mouse strains were collected. Numbers of individuals scored in source populations are indicated in parentheses

Subspecies	Locality	mtDNA	Zfy-2	Tsx	Btk	Abpa		
<i>musculus</i>	Studeneč	(18) 1.000	(10) 1.000	(16) 1.000	(23) 1.000	(18) 1.000		
<i>musculus</i>	Buřkovice	(62) 1.000	(58) 1.000	(136) 1.000	(137) 1.000	(111) 1.000		
<i>domesticus</i>	Straas	(115) 0.009	(65) 0.000	(147) 0.000	(157) 0.004	(133) 0.000		
Subspecies	Locality	ldhI	Gpdl	EsI	Mpi	Np	SodI	
<i>musculus</i>	Studeneč	(11) 1.000	(11) 1.000	(10) 1.000	(11) 1.000	(11) 1.000	(10) 1.000	
<i>musculus</i>	Buřkovice	(17) 1.000	(17) 1.000	(17) 0.941	(17) 1.000	(17) 1.000	(17) 1.000	
<i>domesticus</i>	Straas	(68) 0.088	(67) 0.000	(64) 0.000	(67) 0.000	(67) 0.000	(67) 0.000	

nitrite as a standard. Wilcoxon/Kruskal–Wallis nonparametric tests based on rank sums were used to identify among-strain differences in immunological responses. A procedure implemented in JMP statistical software (SAS Institute Inc. 2002) was used to analyze the data.

Results

Genetic Composition of Source Populations of House Mouse Strains

In total, 8 inbred strains were developed by us. Before defining these strains, the genetic composition of source populations based on diagnostic markers is presented to attest to the purity of their genomes.

One source population, from the village of Studeneč, is situated within the range of *M. m. musculus* about 250 km east of the center of the Czech portion of the *M. m. musculus*/*M. m. domesticus* hybrid zone, and, as expected, all diagnostic markers in the source population were of the *musculus* type (Table 2). The 2 other source populations, one representing wild *M. m. domesticus* and the other the *M. m. musculus* genome, were sampled about 50 km on either side of the center of the hybrid zone in the villages of Straas and Buřkovice, respectively (Figure 1). The results listed in Table 2 show that only 1 out of 11 loci in Buřkovice (*EsI*) and 3 out of 11 loci in Straas (*mtDNA*, *Btk*, and *ldhI*) were able to introgress across the contact zone, and even these introgressing alleles are found at very low frequencies (maximum 0.088). In addition, some of the alleles that are identical in 2 source populations will be ancestral polymorphisms; therefore, the actual rate of introgression is probably even lower. Hence, the mouse strains derived from these source populations will subsequently be considered as pure *musculus* or *domesticus* strains.

Basic Mouse Strain Characteristics

STUF (Studeneč fertile, *M. m. musculus* origin). The first generation of descendants born in captivity segregated for sterility when crossed with C57BL/10: out of 31 mice tested, 14 were sterile and 17 were fertile (Vyskočilová et al. 2005). Full fertility of hybrid males was established after F₅.

STUS (Studeneč sterile, *M. m. musculus* origin). All progeny delivered by the founding pair generated sterile males in either type of cross with the C57BL/10 mice

(Vyskočilová et al. 2005). No changes in hybrid male sterility were observed in higher generations (F₅–F₁₀). It has been shown that *musculus* interstrain hybrids (STUF × STUS) can be produced and backcrossed to the C57BL/10 mice to map chromosomal regions harboring genes correlated with sterility (Vyskočilová M, Piálek J, unpublished data).

STUP (Studeneč delayed puberty, *M. m. musculus* origin). The progeny of this strain segregated for sterility/fertility until F₁₃ when mated with the C57BL/10 mice. Only fertile males have been produced in crosses with the strain C57BL/6 after generation F₁₉. The hybrids between STUP and C57BL/6 have a delayed onset of spermatogenesis (Piálek J, unpublished data).

BULS (Buřkovice low sperm, *M. m. musculus* origin). Males of this strain have a low number of sperm in the epididymis. In addition, the strain has the lowest mean litter size (3.26 young per litter) in comparison with other strains described (>4 young per litter).

BUSNA (Buřkovice nonaggressive, *M. m. musculus* origin). Since F₁₅, only descendants of males that did not attack the males of the A/J strain were crossed in higher generations.

STRA (Straas aggressive, *M. m. domesticus* origin). Since F₁₅, only males that attacked males of the A/J strain were crossed in higher generations.

STRB (Straas black, *M. m. domesticus* origin). Mice of both sexes have a pronounced black stripe on their dorsal side stretching from the neck to the base of the tail.

STLT (Straas long tail, *M. m. domesticus* origin). This strain and STRB were founded using the same female, but the descendants of either strain were sired by different wild males (Table 1). This is the only strain having a mean tail length greater than body length.

Genetic Polymorphism

Out of 485 SSLP scored, 447 uniquely located and 3 syntenic markers (92.8%) produced PCR products of the expected size under the uniform set of PCR conditions employed. Four primer pairs of SSLP markers (*D10Mit12*, *D11Mit230*, *D15Mit60*, and *D17Mit228*) only amplified alleles of *M. m. domesticus* individuals, whereas 82 markers spread more or less randomly throughout the whole genome only produced bands in some strains.

Fragment analysis of the 25 labeled SSLPs showed that there was only residual polymorphism within the strains

Table 3. Pairwise genetic differentiation based on 361 SSLP markers for the 8 new inbred strains described in this paper. Absolute numbers of different alleles at SSLP loci are above the diagonal and their percentage equivalents are below the diagonal. Gray shaded regions indicate genetic differentiation between the *musculus* and *domesticus* genomes in strains derived from these genomes

	STUF	STUP	STUS	BUSNA	BULS	STRA	STRB	STLT
STUF	—	179	180	202	207	304	305	312
STUP	49.6%	—	188	212	218	287	296	298
STUS	49.9%	52.1%	—	182	204	293	294	295
BUSNA	56.0%	58.7%	50.4%	—	130	295	296	302
BULS	57.3%	60.4%	56.5%	36.0%	—	293	299	300
STRA	84.2%	79.5%	81.2%	81.7%	81.2%	—	137	94
STRB	84.5%	82.0%	81.4%	82.0%	82.8%	38.0%	—	120
STLT	86.4%	82.5%	81.7%	83.7%	83.1%	26.0%	33.2%	—

with the highest observed heterozygosity ranging from $H_o = 0.06$ in strains from Buškovice to $H_o = 0.00$ in strains sampled in Studenec. The mean heterozygosity observed in all strains was $H_o = 0.02$.

We compared the genetic differentiation at 361 SSLP loci yielding PCR products in all developed strains (Table 3). Their distribution covers all chromosomes and is regularly spaced (Figure 2). The mean level of microsatellite polymorphism between 2 groups of inbred strains derived from different subspecies is 82%, whereas genetic differentiation between *M. m. musculus* strains from Studenec (STUF, STUP, and STUS) and Buškovice (BULS and BUSNA), respectively, is lower, reaching 57% on average. Genetic polymorphism among the strains derived from wild *M. m. domesticus* from Straas (STRA, STRB, and STLT) is 33% and among those strains derived from wild *M. m. musculus* from Studenec and Buškovice is 51% and 36%, respectively.

Detailed information on all SSLP markers is given in Supplementary Tables and is also publicly available at http://www.studenec.ivb.cz/projects/inbred_strains (Supplementary Tables 1–4). At this web site, it is possible to submit a query for any pairwise combination of inbred strains in order to retrieve the informative markers for a cross or to download a spreadsheet with the locus names, map positions, and relative allele sizes for each marker for all 12 strains scored. The position of SSLP and allele sizes for the 3 laboratory strains, A/J, C3H/J, and C57BL/6J, given in Supplementary Tables 1–4, were retrieved from <http://www.informatics.jax.org/>.

Morphological Differences

Table 4 presents basic descriptive morphological characteristics for individual strains and their comparison among sexes. Inspection of the table indicates that males were either larger than or equal to females with the exception of BULS (ANOVA, $F_{1,75} = 4.25$, $P = 0.043$). The sexual dimorphism for body mass remains true in groups of strains derived from populations from Studenec (STUF, STUP, and STUS; ANOVA, $F_{1,158} = 6.64$, $P < 0.011$) and Straas (STRA, STRB, and STLT; $F_{1,153} = 26.27$, $P < 0.0001$). For strains from Buškovice (BULS and BUSNA) and all other traits, differences between sexes were not significant.

Post hoc comparisons for strains grouped by locality and sex using a Tukey–Kramer honestly significant difference (HSD) indicated that the *domesticus* strains were both heavier and longer than the *musculus* strains (Straas = C57BL/6 > Buškovice = Studenec, with mean values for body mass of 24.8 = 25.4 > 20.7 = 19.6 g, respectively; ANOVA: $F_{3,466} = 66.60$, $P < 0.0001$; and body length: 92.7 = 91.6 > 87.1 = 86.2 mm, respectively; ANOVA: $F_{3,474} = 61.28$, $P < 0.0001$). All groups differed in tail length (Straas > C57BL/6 > Buškovice > Studenec, with mean values of 91.6 > 83.4 > 69.8 = 67.1 mm, respectively; ANOVA: $F_{3,459} = 473.58$, $P < 0.0001$).

There was also considerable variation in reproductive parameters among the strains (Table 5). The mean litter size was the lowest in strains from Buškovice, significantly higher in strains from Studenec, and the highest in the *domesticus* strains (Buškovice < Studenec < Straas = C57BL/6, with values 3.4 < 5.1 < 6.7 = 7.5, respectively; ANOVA: $F_{3,382} = 88.5$, $P < 0.0001$; pairwise significance tested using Tukey–Kramer HSD comparison). Overall, the *domesticus*-derived strains (from Straas and C57BL/6; mean litter size: 7.3) had larger litter sizes than the *musculus*-derived strains (from Studenec and Buškovice; mean litter size: 4.0; ANOVA: $F_{1,384} = 191.5$, $P < 0.0001$).

A high level of variation was also observed in the mass of male reproductive organs (Table 5). The highest within-locality range was observed for mean testis mass [(left testis + right testis)/2], with males from the STUS strain occupying the lowest rank (0.058 g), whereas that of the STUF males were nearly 50% larger (0.115 g; Table 5). A Tukey–Kramer HSD comparison among localities showed that the *domesticus*-derived males possessed, on average, heavier testes (C57BL/6 = Straas ≥ Studenec > Buškovice, with values for mean testis mass being 0.0908, 0.0908, 0.0813, and 0.0679 g, respectively; ANOVA: $F_{3,286} = 24.4$, $P < 0.0001$) and a heavier left epididymis (C57BL/6 > Straas > Studenec > Buškovice, with values 0.0317, 0.0293, 0.0240, and 0.0195 g, respectively; ANOVA: $F_{3,284} = 163.2$, $P < 0.0001$). The same trend was observed for mean sperm count (Straas = C57BL/6 > C57BL/6 = Studenec > Buškovice, with values 54.1, 50.8, 45.8, and 35.7 sperm per Bürker hemacytometer cell for each group; ANOVA: $F_{3,285} = 42.1$, $P < 0.0001$). Both mean testis mass and left

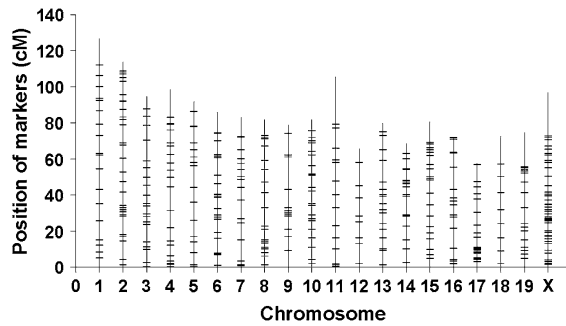


Figure 2. Relative distribution of SSLP markers amplified in all mouse strains except the *Zfy2* intron microsatellite on the Y chromosome. Position of markers (relative to the centromere located at the bottom of each chromosome) is according to Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>).

epididymis mass were highly correlated with mean sperm count ($r^2 = 0.45$; $F_{1,287} = 235.6$, $P < 0.0001$ for testis mass and sperm count and $r^2 = 0.53$; $F_{1,285} = 329.5$, $P < 0.0001$ for epididymis mass and sperm count). A smaller, but still significant, positive correlation was found between mean sperm count and mean litter size sired by a male ($r^2 = 0.19$; $F_{1,149} = 34.4$, $P < 0.0001$).

Sexual Preferences

The *musculus*-derived BULS males and females displayed strong significant homosubspecific preferences (*t*-test, $P < 0.05$; Figure 3), in contrast to the *domesticus*-derived STRA animals (*t*-test, $P > 0.05$; Figure 3). In addition, the comparison between these 2 strains tested separately for both sexes showed that the differences in assortative mating preference were significant (ANOVA, females: $F_{1,40} = 7258$, $P = 0.01$; males: $F_{1,41} = 24\ 362$, $P < 0.001$).

Male Aggression

Dyadic encounters resulted in highly significant differences in aggressiveness between the *musculus*-derived BULS and *domesticus*-derived STRA strains (χ^2 test, $P < 0.001$ for both neutral arena and resident intruder test; Figure 4). The aggressiveness increased with asymmetry of resource value with residents being more aggressive irrespective of the strain. The STRA males were aggressive in all tests with both types of opponents (Figure 4) and always won over BULS males. Conversely, the less aggressive males of the BULS strain elicited fights only rarely and only as the owners of their territory.

Immunological Responses

We found significant differences in BULS and STRA strains in response to *in vitro* stimulation by ConA and LPS. Proliferation of spleen cells differed significantly ($P < 0.001$) between the 2 strains in 2 out of 4 treatments, with

Table 4. Morphological characteristics of wild-derived strains. In each entry, number of individuals scored is followed by mean values of corresponding traits \pm standard deviations

Subspecies	Strain	Body weight (g)		Body length (mm)		Tail length (mm)		Mean age (days)		Number of individuals	
		Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
<i>musculus</i>	STUF	22.3 \pm 2.2	21.9 \pm 2.5	88.3 \pm 2.9	90.0 \pm 3.9	72.8 \pm 3.4	74.5 \pm 3.0	144 \pm 80	139 \pm 61	28	21
<i>musculus</i>	STUP	20.2 \pm 1.9	> 18.9 \pm 1.4	85.6 \pm 2.1	86.5 \pm 3.1	67.1 \pm 5.1	68.7 \pm 5.1	146 \pm 83	146 \pm 65	30	17
<i>musculus</i>	STUS	18.3 \pm 2.3	> 16.9 \pm 2.5	84.0 \pm 3.6	84.3 \pm 4.5	59.9 \pm 4.7	61.4 \pm 5.0	190 \pm 117	211 \pm 90	32	17
<i>musculus</i>	BUSNA	18.4 \pm 2.8	= 18.3 \pm 2.9	83.8 \pm 4.1	= 85.5 \pm 5.8	67.8 \pm 7.3	= 71.3 \pm 7.8	171 \pm 70	133 \pm 63	23	19
<i>musculus</i>	BULS	21.7 \pm 2.3	< 23.0 \pm 3.1	88.3 \pm 3.0	= 88.9 \pm 4.8	70.7 \pm 6.9	= 68.5 \pm 6.5	181 \pm 61	188 \pm 63	47	22
<i>domesticus</i>	STRA	27.5 \pm 2.3	= 26.1 \pm 6.0	94.7 \pm 2.8	= 94.1 \pm 7.6	93.5 \pm 3.8	= 93.1 \pm 5.1	140 \pm 47	102 \pm 52	59	24
<i>domesticus</i>	STRB	24.4 \pm 1.6	> 20.3 \pm 5.0	92.9 \pm 2.1	> 88.6 \pm 8.0	89.3 \pm 3.5	> 84.9 \pm 5.9	152 \pm 69	126 \pm 79	20	20
<i>domesticus</i>	STLT	23.7 \pm 1.5	> 20.3 \pm 5.5	93.0 \pm 2.2	> 88.8 \pm 6.9	95.6 \pm 2.7	> 90.5 \pm 4.3	150 \pm 89	142 \pm 70	15	16
<i>domesticus</i> **	C57BL/6	26.2 \pm 3.1	> 23.6 \pm 4.2	91.6 \pm 3.3	= 91.8 \pm 6.1	83.7 \pm 4.1	= 82.9 \pm 5.5	162 \pm 99	169 \pm 96	26	10

Within strains differences at significance level $\alpha = 0.05$: =, not significant; >, males larger than females; <, males smaller than females.

Table 5. Reproductive parameters of males. Mean age of adult males is as in Table 4 except data for sperm onset in epididymis, where the first number indicates the number of males investigated from the age of 25 to 60 days. Absolute sperm count per epididymis can be calculated using the formula: (mean sperm count \times 2000)/0.0025. Numbers of scored individuals are in brackets

Species	Strain	Mean testis mass (g) ^a	Left epididymis mass (g)	Onset of sperm in epididymis (days)	Mean sperm count	Litter size
<i>musculus</i>	STUF	(28) 0.1154 \pm 0.0102	(28) 0.0262 \pm 0.0025	(8) 33	(28) 47.3 \pm 5.6	(29) 4.38 \pm 2.23
<i>musculus</i>	STUP	(30) 0.0749 \pm 0.0098	(30) 0.0228 \pm 0.0021	(10) 36	(30) 52.1 \pm 8.9	(29) 5.62 \pm 1.74
<i>musculus</i>	STUS	(33) 0.0582 \pm 0.0085	(33) 0.0233 \pm 0.0033	(8) 38	(33) 38.8 \pm 7.4	(37) 5.22 \pm 1.62
<i>musculus</i>	BUSNA	(23) 0.0871 \pm 0.0133	(23) 0.0225 \pm 0.0048	(3) 32	(22) 54.0 \pm 15.6	(35) 4.31 \pm 2.01
<i>musculus</i>	BULS	(55) 0.0599 \pm 0.0107	(28) 0.0183 \pm 0.0024	(6) 33	(55) 28.4 \pm 8.0	(149) 3.26 \pm 1.65
<i>domesticus</i>	STRA	(60) 0.0975 \pm 0.0088	(59) 0.0302 \pm 0.0024	(18) 33	(60) 54.2 \pm 7.8	(48) 8.83 \pm 1.69
<i>domesticus</i>	STRB	(20) 0.0754 \pm 0.0051	(20) 0.0274 \pm 0.0023	(7) 34	(20) 53.2 \pm 7.2	(17) 5.76 \pm 1.99
<i>domesticus</i>	STLT	(15) 0.0843 \pm 0.0047	(15) 0.0283 \pm 0.0023	(12) 35	(15) 55.1 \pm 5.4	(15) 5.33 \pm 1.95
“ <i>domesticus</i> ”	C57BL/6	(26) 0.0908 \pm 0.0089	(26) 0.0317 \pm 0.0045	(12) 36	(26) 50.8 \pm 9.6	(24) 6.75 \pm 1.96

^a Mean testis mass = (left testis + right testis)/2.

the response being stronger in BULS than in STRA in both cases. Similarly, there were clear differences between strain in production of cytokines (such as NO and interleukins IL-6, IL-10, IL-2, and IL-1 β) by peritoneal macrophages stimulated by LPS, with 3 out of 5 tests significant at $P < 0.02$. The same held true for the production of IFN- γ and interleukins IL-4 and IL-10 in spleen cells in response to the ConA treatment (significant differences in 2 out of 3 tests, $P < 0.002$). In 3 out of 5 cases, we detected significantly stronger production of cytokines in BULS than in STRA.

Discussion

Eight new inbred strains have been created from wild populations of both subspecies of the house mouse. Because mice are widely used in biomedical research, these new strains represent a valuable addition to the sources of genetic and morphological variation available from mouse stocks (Bonhomme and Guénet 1996; Festing 1996). In addition, the exact geographic location of founding individuals is known (Table 1), as is the level of genetic polymorphism in source populations (Table 2; Macholán et al. 2007), allowing the rate and effects of genetic reduction due to inbreeding to be estimated (Vyskočilová M, Piálek J, unpublished data). This information, supplemented by complete knowledge of the genetic pedigree of strains, greatly improves the usefulness of these strains as a genetic resource compared with that of laboratory mice, whose unspecified origin hampers the interpolation of studies related to evolutionary processes (Payseur and Hoekstra 2005; Boursot and Belkhir 2006; Harr 2006; Payseur and Place 2007).

The motive for developing these inbred mice was to obtain highly characterized strains that can be potentially exploited to identify barriers preventing gene flow between house mouse subspecies. Two prerequisites are necessary for such studies: there must be sufficient genetic polymorphism to allow genetic mapping of quantitative traits

and high interstrain phenotype variation. Our data suggest that we have succeeded in obtaining both.

First, our results show that on average, 298 of the 361 randomly chosen microsatellite markers are fixed for different alleles in our *musculus*- and *domesticus*-derived inbred strains and 136 are fixed between the groups of *musculus* inbred strains derived from Studenec and Buškovice. Given that chromosome length ranges from 1361 (Dietrich et al. 1996) to 1630 cM (Shifman et al. 2006), the mean spacing between markers for the *domesticus* versus *musculus* genomes ranges from 4.6 to 5.5 cM and for the 2 groups of *musculus*-derived strains (Buškovice vs. Studenec) from about 10 to 12 cM. Silver (1995) estimated that for detecting a linkage signal in 40 backcross samples in the house mouse, 86 genetic diagnostic markers are required to ensure a 10-cM (\approx 20 Mb) swept radius coverage. Because the mean spacing between markers in our set of strains falls well within this limit, the coverage of strain genomes by markers is dense enough for mapping QTLs in strains with different phenotypes.

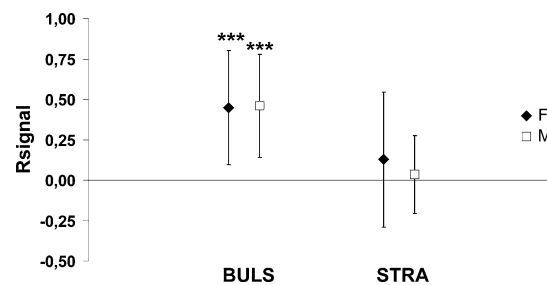


Figure 3. Sexual preferences for urinary signals in *musculus*-derived BULS and *domesticus*-derived STRA inbred strains. Homosubspecific preference is represented by mean $R_{\text{signal}} \pm$ standard deviation (see text) and significant values for Student's t -test ($H_0: \mu = 0$) are indicated by asterisks; *** $P < 0.005$.

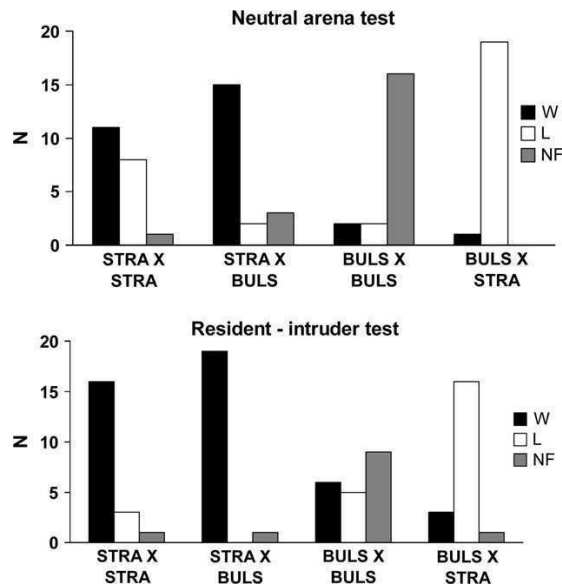


Figure 4. Results of neutral cage arena and resident–intruder test for males of the *musculus*-derived BULS and *domesticus*-derived STRA inbred strains. For each encounter and type of test, the strains of tested and opponent males are listed as tester × opponent. The results of each encounter were classified based on behavior of the tested male and 3 contest outcomes were possible: winner (W), loser (L), or no fight (NF).

This study also documents high interstrain phenotypic variation. In fact, the representatives of *musculus*- and *domesticus*-derived strains (BULS and STRA) have been shown to differ for nearly all morphological traits scored and also in male aggressiveness and assortative mating in both sexes. Moreover, data from in vitro immunological responses suggest that immunoresponsiveness to various mitogens differs substantially between these 2 strains. Although some variation could be attributed to nongenetic factors, the high phenotypic differentiation observed among these strains suggests that significant genetic variation associated with phenotypes has been preserved. This example illustrates the potential usefulness of the genetic differentiation selected for in these strains to evolutionary studies in the *musculus*–*domesticus* hybrid zone, and further studies are underway to compare more pairs of the strains described here.

The traits contributing to an individual’s fitness are of great interest for inferring evolutionary processes. For example, in this regard, one of the most obvious traits is sterility in hybrid males. The 2 *musculus* strains, STUS and STUF, derived from Studenec and producing alternative phenotypes (sterile and fertile offspring, respectively) in crosses with C57BL laboratory mice could be used to search for genetic basis of mechanisms dramatically affecting the fitness of males. In addition, among strains, there is a clear link between reproductive organs of males and their fitness,

with mean testes mass and left epididymis mass positively related to sperm count, which in turn was correlated with mean litter size (see Tables 3–5). Therefore, future experiments using these strains and designed to find QTL correlates of reproductive organ mass in males, and consequently their ability to sire a higher/lower number of offspring, could highlight the processes affecting the dynamics of the hybrid zone.

The ability of an organism to cope with pathogens has a direct effect on its fitness, although this relationship is far from fully understood as a result of its complexity (Lochmiller and Deerenberg 2000; Lee 2006). Our in vitro tests using one representative *musculus*- and one *domesticus*-derived strain indicate clear differences in immune responses to an array of pathogens. This result could reflect subspecies-specific host–pathogen evolutionary histories that may be critical for maintaining the hybrid zone between house mouse subspecies (Sage et al. 1986; Moulia et al. 1991). However, it is not yet clear to what extent immune responses to the mitogens used here reflect resistance to natural pathogens (Gouïy de Bellocq et al. 2007). In addition, given the trade-off between immune defense and other fitness components that must share common and limited resources (e.g., reproduction, growth, and development), different strains may also vary in their relative investment in immune defense. Future work will assess the fitness effects of variation in immunocompetence in all these *musculus*- and *domesticus*-derived strains; however, even this single example indicates, once again, the potential usefulness of these strains in evolutionary studies.

Although we have not directly tested the relationship between behavioral traits and fitness components here, there is a wealth of evidence indicating that behavioral patterns are under selection. For example, assortative mating may result in behavioral isolation, representing a strong premating barrier to gene flow and preventing introgression between isolated gene pools (Coyne and Orr 2004 and references therein). In fact, it has been repeatedly shown that the 2 house mouse subspecies are able to discriminate each other and prefer members of their own subspecies and that *M. m. musculus* mice display stronger preferences for homosubspecific signals (Laukaitis et al. 1997; Christophe and Baudoin 1998; Talley et al. 2001; Smadja and Ganem 2002, 2005; Smadja et al. 2004; Bímová et al. 2005). Our results corroborate these studies because irrespective of the sex, the *musculus*-derived BULS mice preferred their own subspecific urinary signal.

Studies relating the level of male aggressiveness in laboratory strains and asymmetry in reproductive output date to the 1970s (Horn 1974; Kuse and DeFries 1976). Asymmetry in the outcome of encounters have also been reported between males from *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*, with the latter winning the contests (Thuesen 1977; van Zegeren and van Oortmerssen 1981). More recently, QTL mapping in laboratory mouse strains selected for nonaggressiveness and aggressiveness has suggested a polygenic inheritance of male fighting behavior (Brodtkin et al. 2002; Roubertoux et al. 2005). Both the sexual

preferences and the levels of male aggressiveness identified in the *musculus*-derived BULS and *domesticus*-derived STRA strains in this study show that behavioral phenotypes may determine asymmetries in fitness between individuals and strains and, hence, make good candidates for genetic mapping of behavioral isolation. Again, this example demonstrates the potential usefulness of these strains as models for more complex processes occurring in wild populations across the hybrid zone.

In conclusion, this work has resulted in the production of 8 new inbred strains, 3 representing the *M. m. domesticus* and 5 *M. m. musculus* genomes. As demonstrated by the genotyping of 400 microsatellite loci, our inbreeding regime removed nearly all genetic variation from each strain while maintaining high interstrain variation for traits that may be important to the process of speciation; importantly, many of these loci are diagnostic for distinguishing inter- and intrasubspecific strains. In addition, given that controlled breeding conditions were identical for each strain, any interstrain phenotypic differences can be explained by genetic differences, a prerequisite for performing QTL mapping; in fact, 2 strains, the *musculus* strain BULS and the *domesticus* strain STRA were shown here to have significant differences in morphological, behavioral, and immunological traits. Because these phenotypic traits are also correlated with various fitness components, these new house mouse strains potentially represent a powerful tool for inferring the evolutionary processes occurring in the *musculus*–*domesticus* hybrid zone and the genetics of speciation in general.

Supplementary Material

Supplementary tables can be found at <http://www.jhered.oxfordjournals.org/>.

Funding

Academy of Sciences of the Czech Republic (projects A6045902, IAA6093201, IAA600930506, IAA600930608, KJB600930701); Czech Science Foundation (206/06/0955); Czech Ministry of Education (LC06073).

Acknowledgments

We wish to thank all our colleagues at the Department of Population Biology at Studenec for their enthusiasm and cheerfulness throughout this intensive breeding regime. Jan Zima is thanked for his continuous support of our work.

References

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

Boissinot S, Boursot P. 1997. Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome? *Genetics*. 146:1019–1034.

Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J, Chapman VM, Moriwaki K, Nevo E, Thaler L. 1984. Biochemical diversity and evolution in the genus *Mus*. *Biochem Genet*. 22:275–303.

Bonhomme F, Guénet J-L. 1996. In: Lyon MF, Rastan S, Brown SDM, editors. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford: Oxford University Press. 1577–1596.

Boursot P, Belkhir K. 2006. Mouse SNPs for evolutionary biology: beware of ascertainment biases. *Genome Res*. 16:1191–1192.

Boursot P, Din W, Anand R, Darviche D, Dod B, Deimling FV, Talwar GP, Bonhomme F. 1996. Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny. *J Evol Biol*. 9:391–415.

Božiková E, Munclinger P, Teeter KC, Tucker PK, Macholán M, Piálek J. 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. *Biol J Linn Soc*. 84:363–378.

Brodkin ES, Goforth SA, Keene AH, Fossella JA, Silver LM. 2002. Identification of quantitative trait loci that affect aggressive behavior in mice. *J Neurosci*. 22:1165–1170.

Christophe N, Baudoin C. 1998. Olfactory preferences in two strains of wild mice, *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*, and their hybrids. *Anim Behav*. 56:365–369.

Coyne JA, Orr HA. 2004. Speciation. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Davison MT, Linder CC. 2004. Historical foundations. In: Bullock HJ, Bullock G, Petrusz P, editors. The laboratory mouse, the handbook of experimental animals. London: Elsevier.

Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant M, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, et al. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 380:149–152.

Dod B, Smadja C, Karn RC, Boursot P. 2005. Testing for selection on the androgen-binding protein in the Danish mouse hybrid zone. *Biol J Linn Soc*. 84:447–459.

Festing MFW. 1996. Origin and characteristics of inbred strains of mice. In: Lyon MF, Rastan S, Brown SDM, editors. Genetic variants and strains of the laboratory mouse, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 1537–1576.

Frazer KA, Wade CM, Hinds DA, Patil N, Cox DR, Daly MJ. 2004. Segmental phylogenetic relationships of inbred mouse strains revealed by fine-scale analysis of sequence variation across 4.6 mb of mouse genome. *Genome Res*. 14:1493–1500.

Goüy de Bellocq J, Porcherie A, Moulia C, Morand S. 2007. Immuno-competence does not correlate with resistance to helminth parasites in house mouse subspecies and their hybrids. *Parasitol Res*. 100:321–328.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126:131–138.

Gregorová S, Forejt J. 2000. PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol*. 46:31–41.

Harr B. 2006. Genomic islands of differentiation between house mouse subspecies. *Genome Res*. 16:730–737.

Holán V, Sedláčková K, Růžicková M. 1996. Production of high levels of Th1 and Th2 cytokines in mice with acquired transplantation tolerance. *Cell Immunol*. 174:7–12.

Horn JM. 1974. Aggression as a component of relative fitness in four inbred strains of mice. *Behav Genet*. 4:373–381.

Kuse AR, DeFries JC. 1976. Social dominance and Darwinian fitness in laboratory mice: an alternative test. *Behav Biol*. 16:113–116.

- Laukaitis CM, Critser ES, Karn RC. 1997. Salivary androgen-binding protein (ABP) mediates sexual isolation in *Mus musculus*. *Evolution*. 51:2000–2005.
- Lee KA. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr Comp Biol*. 46:1000–1015.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*. 88:87–98.
- Macholán M, Kryštufek B, Vohralík V. 2003. The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriol*. 48:177–188.
- Macholán M, Munclinger P, Šugerková M, Dufková P, Bimová B, Božiková E, Zima J, Piálek J. 2007. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution*. 61:746–771.
- Mouliat C, Aussel JP, Bonhomme F, Boursot P, Nielsen JT, Renaud F. 1991. Wormy mice in a hybrid zone: a genetic control of susceptibility to parasite infection. *J Evol Biol*. 4:679–687.
- Munclinger P, Boursot P, Dod B. 2003. B1 insertions as easy markers for mouse population studies. *Mamm Genome*. 14:359–366.
- Munclinger P, Božiková E, Šugerková M, Piálek J, Macholán M. 2002. Genetic variation in house mice (*Mus*, Muridae, Rodentia) from the Czech and Slovak Republics. *Folia Zool*. 51:81–92.
- Nagamine CM, Nishioka Y, Moriwaki K, Boursot P, Bonhomme F, Lau YFC. 1992. The *musculus*-type Y chromosome of the laboratory mouse is of Asian origin. *Mamm Genome*. 3:84–91.
- Orth A, Lyapunova E, Kandaurov A, Boissinot S, Boursot P, Vorontsov N, Bonhomme F. 1996. L'espece polytypique *Mus musculus* in Transcaucasie. *C R Acad Sci III Sci Vie*. 319:435–441.
- Payseur BA, Hoekstra HE. 2005. Signatures of reproductive isolation in patterns of single nucleotide diversity across inbred strains of mice. *Genetics*. 171:1905–1916.
- Payseur BA, Krenz JG, Nachman MW. 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution*. 58:2064–2078.
- Payseur BA, 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*. *Biol J Linn Soc*. 84:523–534.
- Payseur BA, Place M. 2007. Searching the genomes of inbred mouse strains for incompatibilities that reproductively isolate their wild relatives. *J Hered*. 98:115–122.
- Penn DJ. 2002. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the MHC. *Ethology*. 108:1–21.
- Raufaste N, Orth A, Belkhir K, Senet D, Smadja C, Baird SJE, Bonhomme F, Dod B, Boursot P. 2005. Inferences of selection and migration in the Danish house mouse hybrid zone. *Biol J Linn Soc*. 84:593–616.
- Roubertoux PL, Guillot PV, Mortaud S, Pratte M, Jamon M, Cohen-Salmon C, Tordjman S. 2005. Attack behaviors in mice: from factorial structure to quantitative trait loci mapping. *Eur J Pharmacol*. 526:172–185.
- Sage RD, Heyneman D, Lim KC, Wilson AC. 1986. Wormy mice in a hybrid zone. *Nature*. 324:60–62.
- SAS Institute Inc. 2002. JMP. The statistical discovery software. Cary (NC): SAS Institute.
- Shifman S, Bell JT, Copley RR, Taylor MS, Williams RW, Mott R, Flint J. 2006. A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biology*. 4:2227–2237.
- Silver LM. 1995. Mouse genetics. Concepts and applications. New York: Oxford University Press.
- Smadja C, Catalan J, Ganem G. 2004. Strong premating divergence in a unimodal hybrid zone between two subspecies in the house mouse. *J Evol Biol*. 17:165–176.
- Smadja C, Ganem G. 2002. Subspecies recognition in the house mouse: a study of two populations from the border of a hybrid zone. *Behav Ecol*. 13:312–320.
- Smadja C, Ganem G. 2005. Asymmetrical reproductive character displacement in the house mouse. *J Evol Biol*. 18:1485–1493.
- Talley HM, Laukaitis CM, Karn RC. 2001. Female preference for male saliva: implications for sexual isolation of *Mus musculus* subspecies. *Evolution*. 55:631–634.
- Thuesen P. 1977. A comparison of the agonistic behaviour of *Mus musculus musculus* L. and *Mus musculus domesticus* Ruddy (Mammalia, Rodentia). *Vidensk Medd Dan Nathist Foren*. 140:117–128.
- van Zegeren K, van Oortmerssen GA. 1981. Frontier disputes between the West- and East-European house mouse in Schleswig-Holstein, West Germany. *Z Säugetierkd*. 46:363–369.
- Vyskočilová M, Trachtulec Z, Forejt J, Piálek J. 2005. Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biol J Linn Soc*. 84:663–674.
- Wade CM, Daly MJ. 2005. Genetic variation in laboratory mice. *Nat Genet*. 37:1175–1180.
- Wade CM, Kulbokas EJ, Kirby AW, Zody MC, Mullikin JC, Lander ES, Lindblad-Toh K, Daly MJ. 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*. 420:574–578.

Received May 16, 2007

Accepted August 28, 2007

Corresponding Editor: Muriel Davisson.

Článek C

Polymorphism in Hybrid Male Sterility in Wild-derived *Mus musculus musculus* Strains on Proximal Chromosome 17

Pasláno do *Mammalian Genome*

VYSKOČILOVÁ, M., PRAŽANOVÁ, G. & PIÁLEK, J.

Pro tuto práci jsem připravila experimentální křížení myší, vyšetřila plodnost samců, provedla mapování QTL sterility hybridů a podílela se na psaní publikace.

**Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus*
musculus strains on proximal chromosome 17**

Martina Vyskočilová¹, Gabriela Pražanová², Jaroslav Piálek¹

¹ *Department of Population Biology, Institute of Vertebrate Biology, Academy of Science of the Czech Republic, CZ-675 02 Studenec 122, Czech Republic*

² *University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

Running title: M. VYSKOČILOVÁ ET AL.: STERILITY IN HOUSE MOUSE HYBRIDS

Corresponding author: Jaroslav Piálek

E-mail: jpialek@brno.cas.cz

Fax number: +420568423121

Abstract

The *hybrid sterility-1 (Hst1)* locus at the proximal part of Chr 17 causes male sterility in crosses between the house mouse subspecies, *Mus musculus domesticus* (Mmd) and *M. m. musculus* (Mmm). This locus has been defined by the presence of polymorphism in two classical laboratory strains (representing the Mmd genome) when mated to PWD/Ph mice (Mmm genome): C57BL/10 (carrying the sterile allele) and C3H (carrying the fertile allele). The occurrence of sterile and/or fertile (wild Mmm x C57BL)F₁ males is evidence that polymorphism for this trait also exists in natural populations of Mmm; however, the nature of this polymorphism remains unclear. Therefore, we derived two wild-origin Mmm strains, STUS and STUF, that produce alternative phenotypes in crosses with C57BL mice (sterile and fertile males, respectively). To determine the genetic basis underlying male fertility, the (STUS × STUF)F₁ females were mated to C57BL/10J males. About a third of resulting hybrid males (33.8%) had a significantly smaller epididymis and testes than parental animals, and lacked spermatozoa. Testes histology revealed that the Sertoli cells of these males had spermatogonia and spermatocytes, but spermatogenesis ceased at zygotene/pachytene stage. A further one fifth of males (20.3%) also had anomalous reproductive traits but produced some spermatozoa; the testes of these males had spermatocytes and round spermatids in nearly 60% of their seminiferous tubules, but most of these were impaired and phagocyted. The remaining fertile males (45.9%) displayed no deviation from values found in parental individuals, and accordingly, exhibited normal spermatogenesis. QTL analysis of the progeny revealed strong associations of male's fitness components with the proximal end of Chr 17. In addition, a significant effect of the central section of Chr X on testes mass and a suggestive signal for sperm count and epididymis weight at the distal end of Chr 3 were detected. The data suggest that genetic incompatibilities associated with male sterility have evolved independently at the proximal end of Chr 17 and are polymorphic within both Mmd and Mmm genomes.

The evolution of barriers to reproductive isolation during speciation remains mysterious and much of our knowledge relies upon studies of the fruitfly, *Drosophila* (Coyne and Orr 2004; Orr *et al.* 2004; Sawamura *et al.* 2004; Orr 2005; Masly and Presgraves 2007). A review listing the interspecific experimental crosses that have been tested suggests that the genes causing hybrid sterility or inviability often appear fixed within species (Coyne and Orr 2004). However, in most of these studies, the crosses involved genetically distant species that do not readily hybridize in nature; and consequently, the generalizations derived from the results might reflect processes at the late stages of speciation, or even processes after its completion, rather than speciation itself. Indeed, where more closely related taxa and intraspecific variation have been studied, polymorphism in sterility has been detected (e.g., *D. mojavensis* and *D. arizonae*: Reed and Markow 2004; *Mimulus guttatus* and *M. nasutus*: Sweigart *et al.* 2007).

Two subspecies of the house mouse, *Mus musculus domesticus* (Mmd) and *M. m. musculus* (Mmm) have become mammalian models for the study of isolation barriers because they have undergone a fairly recent radiation (0.5 MYA; Boursot *et al.* 1993), form a well-documented natural hybrid zone (Raufaste *et al.* 2005; Macholán *et al.* 2007, in press; Teeter *et al.* 2008), and can produce sterile male hybrid (reviewed by Forejt 1996 and Good *et al.* 2008b). Studies on the genetic architecture of hybrid sterility suggest that loci located on Chr 17 (Forejt and Iványi 1975) and Chr X are involved in sterility (Oka *et al.* 2004; Storchová *et al.* 2004; Good *et al.* 2008b); there is little information on evolution of the sterility within the two subspecies. This is mainly because such an investigation would require the mapping of sterility polymorphism in natural populations and its genetic dissection to identify chromosomal segments with which it is associated.

The hybrid male sterility locus, *Hst1*, represents a candidate for the study of sterility polymorphism. This gene was described in F₁ progeny from intersubspecific crosses between wild Mmm and two classical laboratory strains (Forejt and Iványi 1975). The locus was mapped to the proximal portion of Chr 17 and defined by differences in the *Hst1* region; more specifically, Mmd derived C57BL/10J or C57BL/6J (B10 or B6) mice carry the sterile allele *Hst1^s* and C3H mice carry the fertile allele *Hst1^f*, while Mmm mice possess *Hst1^{ws}* and/or *Hst1^{wf}* alleles (Forejt and Iványi 1975; Forejt 1996). While much effort has been focused on identifying allelic differences between the two Mmd laboratory strains (Forejt and Iványi 1975; Forejt 1981; Trachtulec *et al.* 1994, 1997, 2005, 2008), surprisingly, the results documenting the presence of *Hst1* in natural populations of Mmm has been ignored, despite the fact that the very first report of sterility polymorphism was based on crossing B10 females

and different wild Mmm males (Iványi *et al.* 1969). A subsequent study also mentioned that some Mmm males trapped in central and northern Europe (Prague, Czech Republic and Jutland Denmark, respectively) fathered only sterile sons, only fertile sons or had both types of son in their litters (Forejt and Iványi 1975).

Recently we described polymorphism in sterility/fertility in hybrid males that were produced in reciprocal crosses between wild Mmm and B10 mice (Vyskočilová *et al.* 2005). We found that sterile males had significantly lower testis and epididymis weight compared with fertile males and the size of reproductive organs was dependent on cross reciprocity within the classes of sterile and fertile males. Although our phenotype data resembled those published in the original description of *Hst1* by Forejt and Iványi (1975), molecular analyses revealed incomplete segregation of sterility and fertility in male progeny and markers from the *Hst1* region in some families (Vyskočilová *et al.* 2005). In addition, descendants of one wild pair produced only sterile males and this trait uniformity prevented genetic mapping of sterility at that time. However, the progeny of this and another pair of wild mice were used to derive two Mmm strains, STUS and STUF, which produce sterile and fertile hybrid males, respectively, in crosses with C57BL mice (Piálek *et al.* 2008).

In this paper we analyze sperm count, testis and epididymis weight and testicular cross-sections of the two Mmm and B10 strains, their F₁ hybrids, and backcrossed progeny from inter-strain crosses between the Mmm strains and B10 mice. A genome-wide scan of the backcrossed hybrids is used to identify the genetic basis of polymorphism of male fitness in the Mmm strains.

Material and Methods

Animals. The ancestors of two Mmm strains, STUF and STUS, were trapped in the village of Studenec, Czech Republic (49° 11' N, 16° 03' E) in November 2000 (Piálek *et al.* 2008). The B10 mice were purchased from a local provider (VELAZ Praha). Females of the strains STUS at F₈-F₉ and STUF at F₉-F₁₀ generation of brother-sister breeding were mated with males of the same strain and with the B10 mice to obtain data for parental strains and their F₁ hybrids. Nine (STUS × STUF)F₁ females were crossed with B10 males and delivered males were scored as explained below. All mice were kept in a breeding facility of the Institute of Vertebrate Biology in Studenec in accordance with animal welfare regulations in the Czech Republic.

Phenotyping. All males were weaned at 20 days postpartum and caged singly, dissected at age 60 days and phenotyped as described by Vyskočilová *et al.* (2005). Briefly, both testes and the left epididymis were weighted and the mean testis weight was calculated. The left testis was fixed in Bouin's solution for histological examination. Spleen was removed and stored in 96% ethanol for DNA isolation. Spermatozoa were released from the whole left epididymis and the number of sperm heads were counted in 10 chambers in a Bürker haematocytometer. The average value over 10 chambers was used as the measure of the individual's sperm count. The fixed testis was embedded in paraffin, sectioned into 4- μ m slices, stained with hematoxylin-eosin and observed under a light microscope. In total, 218 males were phenotyped and 74 of these were used for QTL analysis.

Molecular and statistical analyses. Genomic DNA was extracted using DneasyTM Tissue Kit (Qiagen) from ethanol-preserved spleen. One male and one female from each strain were analyzed for the presence of strain-specific markers. A genomewide scan was performed using 103 microsatellite markers, chosen so that mean intermarker distances were 10-20 cM with the exception of Chr 7 and X. For Chr 7, 11 microsatellites with map positions between 10 cM to 45 cM were tested, but these markers were unsuitable for QTL analysis since they displayed the same allelic form in both STUS and STUF. For Chr X we failed to find discriminating markers at the most distal section, including the pseudoautosomal region (PAR). The map positions of microsatellites were retrieved from the Mouse Genome Database of The Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org) and Whitehead Institute (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/ENSEMBL_v19.30.1). PCR and electrophoretic conditions followed protocols given in Piálek *et al.* (2008).

Map Manager QTX (Manly *et al.* 2001) was used to identify associations between chromosomal segments and traits measured. The significance levels were calculated in terms of likelihood ratio statistic (LRS) obtained from 1000 permutations. The likelihood of odds (LOD) statistics was obtained by dividing the LRS by 4.61 (twice the natural logarithm of 10). Confidence intervals for particular QTLs were estimated by bootstrap analysis (Walling *et al.* 1998) as implemented in the MapManager QTX. The same software was also used to search for interactions between pairs of QTL loci. Putative interactive loci were investigated by using a two-stage test, in which only the pairs of loci that showed a value of $P < 0.00001$ for the total effect and a value of $P < 0.01$ for the interaction effect were considered positive for interaction (Manly *et al.* 2001).

Results

Parental strains and F_1 hybrids. Differences in reproductive parameters between parental strains are listed in Table 1. STUF males have the highest values of mean testis and epididymis weight and sperm count. The most pronounced difference between strains is found for mean testis weight, where the value for STUF males (115 mg) is nearly double that of for STUS males (60 mg). In general, hybrids between STUF and B10 have higher values for reproductive parameters than the mean of the two strains, and the differences are more pronounced in litters sired by B10 males. The hybrid males resulting from crosses between STUS and B10 mice exhibit uniformly small testes and epididymis, with no spermatozoa in their epididymis irrespective of cross type (Table 1).

Phenotype data of backcrossed males. The number of mean spermatozoa found in (STUS \times STUF) F_1 \times B10 males ranges from 0 to 59.7×10^6 and the mean sperm count \pm SD is $19.3 \pm 20.4 \times 10^6$. The frequencies of mean sperm count in progeny resemble a bimodal distribution with a clear gap around the mean value (Fig. 1A). Of 40 hybrid males with mean sperm count grouped below the gap, 25 hybrids lacked sperm and 15 hybrids had some sperm (mean $4.2 \pm 4.7 \times 10^6$; range $0.08 - 15.4 \times 10^6$) in their epididymis. These two types of males also differ in testes histology (see below); consequently, we will consider this group as consisting of two classes of males – ‘no sperm males’ (hereafter NSM) and ‘few sperm males’ (FSM). Finally, all males with the mean sperm count above the gap in Fig. 1A will be designated as ‘fully fertile males’ (FFM), as they approach the reproductive parameters of the parental strains.

The mean weights of testis in the three sets of males are 38.7 ± 5.0 mg (NSM), 64.3 ± 10.7 mg (FSM), and 107.1 ± 12.1 mg (FFM), the latter values being within the range of those of parental strains. The minimum mean testis weight is 31.7 mg and the maximum 128.8 mg. The distribution of mean testis weights displays a U-shaped pattern, but without a gap near the mean value (Fig. 1B). The mean epididymis weight is similar for NSM and FSM (18.2 ± 1.4 and 19.2 ± 2.4 mg, respectively) and higher in the FFM (26.8 ± 2.7 mg). The minimum and maximum values for epididymis weight are 14.6 and 33.9 mg, respectively. The three traits were strongly correlated (pairwise correlations were $r^2 = 0.95$ for sperm count and mean testis weight, $r^2 = 0.95$ for mean sperm count and epididymis weight, and $r^2 = 0.91$ for mean testis and epididymis weight).

Testes histology. Testes cross-sections reveal the presence of three histological phenotypes. All seminiferous tubules in NSM are atrophied with a disintegrated germ cell layer (Fig. 2A). In addition, the Sertoli cells contain spermatogonia and pachytene/zygotene spermatocytes

and the lumen of tubules is filled with degenerated apoptotic primary spermatocytes (Fig. 2B). Similarly, the FSM display disturbed spermatogenesis in all tubules (Fig. 2C); however, although the Sertoli cells are populated with normally developed spermatogonia and spermatocytes; round spermatids are present in only 59% of tubules (75 tubules in 5 FSM were analyzed). These spermatids are mostly impaired, typically with defective acrosomal development, and found in apoptosis or phagocytosed (Fig. 2D). Elongated spermatids are found only rarely and have defective acrosomes and head shapes. Figs. 2E and 2F show regular spermatogenesis in FFM.

Mapping chromosomal segments associated with sterility. Genome scan reveals the highest significant association between mean sperm count and the marker *D17CH07* on Chr 17 (Fig. 3A). This QTL region accounts for 90% of the total additive genetic variance of the phenotype. The highest peak covers the most proximal half of Chr 17 and its maximum LRS of 168.5 is above the highly significant value of 19.4 ($LOD = 36.63$, $p < 0.001$). The same QTL region is also significantly associated with testis and epididymis weight, and the LRS of 120.7 and 105.8 were above the highly significant value of 21.3 and 23.0, respectively. These QTLs account for 83% and 77% of the total genetic variance of mean testis and epididymis weight, respectively.

Chr X shows significant association with testis weight, and suggestive association with sperm count. LRS of testis weight displays a broad peak stretching from the middle to the distal part of Chr X, bounded by markers *DXMit119* and *DXMit131* (Fig. 3B). This broad peak has two significant maxima of LRS, 13.5 ($LOD = 2.94$, $p < 0.05$) and 13.6 ($LOD = 2.96$, $p < 0.05$) and the QTL accounts for 17% of the total variance of testis weight. Suggestive associations for sperm count and the same microsatellites on Chr X are observed with a maximum LRS of 7.5 ($LOD = 1.63$, Fig. 3C). This QTL explains 10% of the total genetic variance of the sperm count.

Finally, suggestive QTL effects are also found near the locus *D3Mit57* on a distal part of Chr 3. The observed LRS values are 8.5 and 7.1 for epididymis weight ($LOD = 1.85$, Fig. 3D) and sperm count ($LOD = 1.55$), respectively.

Table 2 lists the detected interactions between loci. In addition to the three chromosomes involved in single QTL mapping, two additional chromosomes appear to contribute to hybrid male fitness: two QTL-QTL interactions for mean sperm count were detected (Chr 10, 17 and X, three interactions for testis weight were found on Chr 10, 17, 18 and X, and two interactions for epididymis weight were evident on Chr 10, 17 and X).

Discussion

In this paper we examined the genetic basis of hybrid male sterility polymorphism observed in two wild-derived Mmm strains STUF and STUS. We found that, irrespective of cross type, (STUF x B10) F_1 hybrids between are fully fertile, while the (STUS x B10) F_1 males are completely sterile. The uniformity of the phenotypic traits in these two classes of F_1 males, and the pronounced difference between their values, suggest that STUF and STUS mice differ in one or a several genes that are associated with sterility. The number of genes involved can be predicted from the distribution pattern of progeny from the experimental cross: (STUS x STUF) F_1 females x B10 males. If only one gene is involved, then the distribution of the traits in the resulting backcross progeny is expected to be strictly bimodal; the more genes that are needed to cause sterility, the larger the deviation from bimodality. Our results show that the sperm count has a typical bimodal distribution with a gap between the two peaks (one for sterile, and one for fertile males) and, hence, seems to agree with the first prediction. However, the testis and epididymis weights displayed a less obvious pattern of bimodality (compare Figs. 1A and 1B; data not shown for epididymis). It may be that the U-shaped distribution of testis and epididymis weights could still be mainly explained by the breakdown of spermatogenesis: since the physical absence of sperm results in lighter reproductive organs, and the degree of breakdown is correlated with organ weight, resulting in a the bimodal distribution. That the breakdown of spermatogenesis has a cascade effect upon other organs is supported by strong inter-correlations between the three reproductive parameters measured here, previously documented in intersubspecific mouse crosses (Britton-Davidian *et al.* 2005, Good *et al.* 2008b).

The testes histology of sterile males provides evidence of spermatogenesis impairment at two levels. In NSM, sperm development is arrested at the pachytene/zygotene stages of meiosis, and exhibits characteristics similar to the spermatogenic arrest described in intersubspecific hybrids between the BALB (Mmd) mice (Yoshiki *et al.* 1993) or C57BL (Mmd) mice (Forejt1996) and wild-derived Mmm mice; in both these previous studies arrest was mapped to Chr 17. More recently, meiotic arrest has also been observed in hybrid F_1 male progeny of crosses between Mmd and Mmm wild-derived outbred mice (Britton-Davidian *et al.* 2005), but the genetic correlates were not analyzed. In FSM, spermatogenesis proceeded somewhat further; nevertheless, it resulted in abnormally developed round spermatids in only about 60% of tubules. Very few of these left the Sertoli cells and could be seen as elongated spermatids in the tubular lumen. This abnormal process, named 'spermiogenic defect' (Bolor

et al. 2005) was also reported in consomic strains where Chr X from wild-derived Mmm (Storchová *et al.* 2004) or wild-derived *M. m. molossinus* mice (Oka *et al.* 2004) was backcrossed into the genetic background of the B6 strain, and in intersubspecific F₁ hybrids between wild-derived Mmd and Mmm strains (Britton-Davidian *et al.* 2005; Good *et al.* 2008b).

Our observations of both spermatogenic arrest and spermiogenic defect in hybrid males resulting from the same cross is noteworthy. As far as we know, only one previous study has reported the presence of both these types of sterility in hybrid progeny, from crosses between Smt mice (derived from the DDK, BL6, and CBA strains) and *M. m. molossinus* (Bolor *et al.* 2005). However, it is difficult to discuss the relevance of the origin of hybrid male sterility in natural populations of house mice in that particular study, since three of the mouse genomes were mixed, and the origin of the DDK strain is unknown (Beck *et al.* 2000).

QTL analysis of the (STUS x STUF) x B10 progeny revealed the strongest correlation of male fertility with the proximal portion of Chr 17. This association accounted for 90, 83, and 77% of the additive genetic variance in sperm count, mean testis weight and epididymis weight, respectively. The high values of explained variance are in good agreement with expectations derived from phenotype data that suggested that STUS mice possess a single or only limited number of gene(s) causing impairment of spermatogenesis. All NSM and FSM individuals inherit the STUS allele, but only NSM undergo meiotic arrest. How can FSM proceed with spermatogenesis? Our results suggest that there is at least one other locus acting alone or in combination with the gene(s) on Chr 17 to inhibit its detrimental effect on meiosis I. Unfortunately, because we obtained low numbers of FSM, we are unable to explore this question at this time.

A peak for sterility-associated traits has been found near the marker *DI7CH07* located at distance of 8.25 cM from the centromere (Vyskočilová *et al.* 2005) and closely linked to the *Hst1* locus (Forejt and Iványi 1975; Trachtulec *et al.* 2005). As previously mentioned, the sterility associated with the *Hst1* gene was defined by differences between the Mmd strains in the backcross (C3H x B10) x PWD (Forejt 1996). Interestingly, since the sterility system documented in this study utilized two different Mmm strains, the backcross (STUS x STUF) x B10 is a reciprocal, complementary cross (C3H x B10) x PWD and, therefore, represents an tool that could be exploited for mapping and identifying the *Hst^w* gene. The genetic differences between our two Mmm strains provides the first evidence that polymorphism is present in the region including *Hst1* on Chr 17 not only within the Mmd but also within the Mmm genome. Our observations of transient polymorphism in genetic incompatibilities could

add significantly to the understanding of the origin, spread and fixation of sterility genes within populations.

Our results have only partially explained the possible origin of *Hst1*-related sterility. Since the PWD, STUF and STUS strains were derived from wild populations caught within the range of Mmm (Gregorová and Forejt 2000; Piálek *et al.* 2008), *Hst1*-related sterility has evolved and is recently polymorphic in natural Mmm populations. The origin of sterility seems to be more complex in Mmd mice; however, *Hst1*-related sterility have been reported in classical laboratory mouse strains such as A/Ph, BALB/c, DBA/1, and AKR/J (Forejt and Iványi 1975), supposedly representative of Mmd mice, but actually mosaics of various mouse genomes (*M. m. musculus*, *M. m. mollosinus*, *M. m. castaneus*) on predominantly Mmd background; (ii) a retained ancestral polymorphism that became fixed in some and lost on other classical strains; (iii) a *de novo* mutation that occurred during century of intensive breeding and selection of laboratory mice. The first scenario has recently been disproved: a study of 80 chromosomes from five mouse (sub)species shows that the *Hst1* gene on Chr 17 is of Mmd origin in all classical strains (Trachtulec *et al.* 2008). The following rationale can be adopted to choose between the two latter scenarios: if *Hst1*-related sterility is polymorphic in natural populations, then at least in some crosses in which B6 or B10 mice used for backcrossing are replaced by wild or wild-derived Mmd mice and mated with PWD or STUS, sterility in F1 hybrid males should be evident. On the other hand, if sterility requires mating with classical strains carrying the *Hst1^s* allele then this mutation represents an artificial result without evolutionary consequences. Thus far, there are no records in the literature reporting on the occurrence of *Hst1*-related sterility in crosses between wild Mmd and Mmm mice. In fact, when PWK mice (known to harbor the *Hst1^{ws}* allele; Forejt 1981) were used, and the B10 strain was replaced by the LEWES or WSB mice derived from two different wild Mmd populations in eastern North America, the resulting progeny were either normal (female Mmd x male PWK) or sterile (female PWK x male Mmd), but with a distinct characteristics defining sterility (Good *et al.* 2008b). Furthermore, we did not find any association between hybrid male sterility and Chr 17 in a cross between STUS and wild Mmd mice sampled in western Europe (J. Piálek *et al.* unpublished data). Nevertheless, it would be premature to argue for *de novo* mutation in the *Hst1* gene in the B6/B10 mice. Molecular identification of this gene or a study of more Mmd from various geographic regions could help to resolve this conundrum.

One significant and one suggestive QTL associated with sterility were found on Chr X. The LRS functions for testis weight and sperm count had similar shapes with high values over a long distal portion of the chromosome starting at 69 Mbp (*DXMit119*) and ending at 137 Mbp (*DXMit131*). The signal detected here closely resembles results published by Storchová *et al.* (2004), who introgressed Chr X from PWD mice into the B6 genome, effectively blocking the effect of Chr 17, and observed very similar shape of LRS curves for testes weight and sperm count in the same region of Chr X. The PWD strain was derived from wild mice sampled at a locality near Prague in central Europe (Gregorová and Forejt 2000), about 150 km distant from the village of Studenec where mice used to found both the STUS and STUF strains were collected (Piálek *et al.* 2008). This suggests that the wild mice in this geographic area share similar if not identical QTL coding for testis weight and sperm count. For example, a bootstrap resampling found a significant QTL for sperm count near the same microsatellite *DXMit119* in the (STUS x STUF) x B10 males (Fig. 3C) as in the B6-X^{PWD}X^{B6} x B6 backcross males (Storchová *et al.* 2004). In the consomic strain with a substituted Chr X of the *M. m. molossinus* origin (MSM strain) on the B6 background QTL for testis weight was also found in the distal part of Chr X (Oka *et al.* 2004). However, its position between 136 – 160 Mbp was beyond the map limits of our study, for which the most distal strain-specific marker for STUS and STUF, *DXMit131* was at position 136.8 Mbp. Nevertheless, all the studies discussed above show a reasonable repeatability between laboratories and suggest that the lower significance of QTL found here is not an experimental artifact. However, the joint use of B6/B10 mice to generate hybrid males in these studies may not allow the results to be extrapolated to natural populations. Fortunately, there are recent data allowing to compare results drawn from classical and wild-derived mice.

When classical mouse strains were replaced with the wild-derived Mmd strain, LEWES and PWD or MSM with PWK, and the reciprocal backcrosses were performed, a complex genetic basis of X-linked traits associated with male fitness components was suggested (Good *et al.* 2008a). First, sterility was asymmetric; i.e., the sterile males with lower testis size and sperm count were found only in the (PWK x LEWES) x LEWES backcross type (referred to as Experiment 1), in the same direction as in our study. No sterile males were observed in the opposite type backcross (LEWES x PWK) x PWK (Experiment 2). Second, new QTLs were detected: in Experiment 1, the authors found the most prominent QTL associations in the proximal half of Chr X for both testis weight and sperm count (Fig. 5 in Good *et al.* 2008a). These results are in contrast with those obtained in studies using MSM or PWD on a B6 background, in which QTLs for testis size and sperm count have been positioned consistently

to distal half of Chr X (Oka *et al.* 2004; Storchová *et al.* 2004; this study). In Experiment 2 only strain-specific differences between testis weights could be analyzed. The likelihood profiles of two QTLs identified in the central and distal part of Chr X (Fig. 6 in Good *et al.* 2008a) were in a close agreement with the mapping data reported in this study for crosses employing MSM or PWD repeatedly backcrossed to B10 or B6 mice (Oka *et al.* 2004; Storchová *et al.* 2004).

Together, the data suggest that the sterility associated with a locus(oci) on Chr 17 is caused by spermatogenic (meiotic) arrest, and the X-linked sterility results in a spermiogenic defect. Both types of sterility appear to be carried in the STUS strain and, as they affect spermatogenesis at different stages, the first type of sterility (meiotic arrest) masks later manifestations of sterility (spermiogenic defect). Obviously, if the early type sterility is blocked and spermatogenic arrest does not occur in some backcrossed males, spermiogenic defects can be observed. The QTL-QTL interaction for reproductive parameters between markers on Chr 17 and Chr X found in hybrid progeny in this study is in agreement with this hypothesis. Furthermore, the presence of two sterility types was also independently documented in the PWD mice (*Hst1*: Forejt and Iványi 1975; *Hstx1*: Storchová *et al.* 2004). Below we address frequency of sterility factors in wild mice.

The identification of the *Hst1*-related sterility in the STUS strain presented here completes our earlier data on polymorphism at a population level in wild mice sampled in the village of Studenec (Vyskočilová *et al.* 2005), and enables the estimate of the within-population frequency of sterility alleles. Out of seven Mmm families scored, three families segregated at a locus identical or linked to *Hst1*-related sterility, three families were found polymorphic for other undetermined sterility factor and one family (STUS progenitors) was fixed for *Hst1*-related sterility and segregated (as an conservative estimate) for the other type of sterility (Vyskočilová *et al.* 2005; this study). These results can be used to give an estimate of the sterile allele frequency at a locus within the *Hst1* region of $p = 0.36$ and $p = 0.29$ for an allele associated with other sterility gene(s) not linked to Chr 17. More impressively, an average of 20% of individuals can possess sterility-ensuring alleles at both loci. This finding has important implications for future studies of sterility in the house mouse: first, each strain derived from wild population may carry only one sterility gene (at random), meaning that the resulting data will underestimate the frequency of sterility genes in natural populations. Second, even if a strain is derived from mice harboring more than one incompatibility, types of sterility that manifests themselves earlier in an individual's life cycle will mask the effect of sterility that would appear later (Coyne and Orr 2004), again, underestimating the natural

frequencies of sterility. To avoid these underestimates, it would be possible to select a more sophisticated experimental design using higher number of strains (Britton-Davidian *et al.* 2005; Good *et al.* 2008b). However, because sterility alleles are usually fixed in such strains due to inbreeding, their explanatory scope will be limited to understanding geographic variation in postzygotic barriers and/or their genetics behind each particular sterility. Instead, the studies addressing the evolution of sterility should focus on crosses of wild house mice to establish the geographic distribution of sterility alleles. Such data are a prerequisite to discussing the effects of selection and drift generating and maintaining postzygotic incompatibilities, which might ultimately contribute to speciation.

Acknowledgements

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic, project No. 206-06-0955 and Czech Ministry of Education (LC06073). Most primers for microsatellite markers were kindly provided by Jiří Forejt. Lidka Rousková, Dana Havelková and Jana Piálková assisted in breeding facility. We thank Heidi C. Hauffe, Zdeněk Trachtulec and two anonymous reviewers for their comments on an earlier version of the manuscript.

URL references

Mouse Genome Database of The Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org).

Whitehead Institute (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/ ENSEMBL v19.30.1).

References

- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F. W. & Fisher, E. M. C. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics* **24**, 23-25.
- Bolor, H., Zhao, W. D., Ishikawa, A. & Wakasugi, N. (2005). Arrest of spermatogenesis at the early meiotic stage in the small testis mutant (Smt) mice. *Experimental Animals* **54**, 327-337.
- Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J. & Bonhomme, F. (1993). The evolution of house mice. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 119-152.

- Britton-Davidian, J., Fel-Clair, F., Lopez, J., Alibert, P. & Boursot, P. (2005). Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: estimates from fertility patterns in wild and laboratory hybrids. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 379-393.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Forejt, J. (1981). Hybrid sterility gene located in the *T/t-H-2* supergene on chromosome 17. In: *Current Trends in Histocompatibility*, edited by R. S. Reisfeld and R. A. Ferrone, New York: Plenum Press, pp. 101-131.
- Forejt, J. (1996). Hybrid sterility in the mouse. *Trends in Genetics* **12**, 412-417.
- Forejt, J. & Iványi, P. (1975). Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genetical Research* **24**, 189-206.
- Frazer, K. A., Eskin, E., Kang, H. M., Bogue, M. A., Hinds, D. A., Beilharz, E. J., Gupta, R. V., Montgomery, J., Morenzoni, M. M., Nilsen, G. B., Pethiyagoda, C. L., Stuve, L. L., Johnson, F. M., Daly, M. J., Wade, C. M. & Cox, D. R. (2007). A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* **448**, 1050-1053.
- Good, J. M., Dean, M. D. & Nachman, M. W. (2008a). A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice. *Genetics* **179**, 2213-2228.
- Good, J. M., Handel, M. A. & Nachman, M. W. (2008b). Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution* **62**, 50-65.
- Gregorová S. & Forejt, J. (2000). PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies – a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biologica, Praha* **46**, 31-41.
- Iványi, P., Vojtíšková, M., Démant, P. & Micková, M. (1969). Genetic factors in the ninth linkage group influencing reproductive performance in male mice. *Folia Biologica, Praha* **15**, 401-421.
- Macholán, M., Baird, S. J. E., Munclinger, P., Dufková, P., Bímová, B. J. & Piálek, J. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *BMC Evolutionary Biology* (in press).
- Macholán, M., Munclinger, P., Šugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J. & Piálek, J. (2007). Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* **61**, 746-771.
- Manly, K. F., Cudmore, R. H. & Meer, J. M. (2001). Map manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* **12**, 930-932.

- Masly, J. P. & Presgraves, D. C. (2007). High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biology* **5**, e243.
- Oka, A., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Takagi, N., Takano-Shimizu, T., Toshimori, K., Moriwaki, K. & Shiroishi, T. (2004). Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics* **166**, 913-924.
- Orr, H. A. (2005). The genetic basis of reproductive isolation: Insights from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102 (Suppl. 1)**, 6522-6526.
- Orr, H. A., Masly, J. P. & Presgraves, D. C. (2004). Speciation genes. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 1-5.
- Piálek, J., Vyskočilová, M., Bímová, B., Havelková, D., Piálková, J., Dufková, P., Bencová, V., Ďureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H.C., Macholán, M., Munclinger, P., Storchová, R., Zajícová, A., Holáň, V., Gregorová, S. & Forejt, J. (2008). Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *Journal of Heredity* **99**, 34-44.
- Raufaste, N., Orth, A., Belkhir, K., Senet, D., Smadja, C., Baird, S. J. E., Bonhomme, F., Dod, B. & Boursot, P. (2005). Inferences of selection and migration in the Danish house mouse hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 593-616.
- Reed, L. K., & Markow, T. A. (2004). Early events in speciation: polymorphism for hybrid male sterility in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9009-9012.
- Sawamura, K., Roote, S., Wu, C.-I. & Yamamoto, M. T. (2004). Genetic complexity underlying hybrid male sterility in *Drosophila*. *Genetics* **166**, 789-796.
- Storchová, R., Gregorová S., Buckiová D., Kyselová, V. Divina P. & Forejt, J. (2004). Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome* **15**, 515-524.
- Sweigart, A. L., Mason, A. R. & Willis, J. H. (2007). Natural variation for a hybrid incompatibility between two species of *Mimulus*. *Evolution* **61**, 141-151.
- Teeter, K. C., Payseur, B. A., Harris, L. W., Bakewell, M. A., Thibodeau, L. M., O'Brien, J. E., Krenz, J. G., Sans-Fuentes, M. A., Nachman, M. W. & Tucker, P. K. (2008). Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. *Genome Research* **18**, 67-76.
- Trachtulec, Z., Vincek, V., Hamvas, R. M. J., Forejt, J., Lehrach, H. & Klein, J. (1994). Physical map of mouse chromosome 17 in the region relevant for positional cloning of the *Hybrid sterility 1* gene. *Genomics* **23**, 132-137.

- Trachtulec, Z., Mnuková-Fajdelová, M., Hamvas, R. M. J., Gregorová, S., Mayer, W. E., Lehrach, H. R., Forejt, J. & Klein, J. (1997). Isolation of candidate *Hybrid sterility 1* genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mammalian Genome* **8**, 312-316.
- Trachtulec, Z., Mihola, O., Vlcek, C., Himmelbauer, H., Paces, V. & Forejt, J. (2005). Positional cloning of the *Hybrid sterility 1* gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 637-641.
- Trachtulec, Z., Vlcek, C., Mihola, O., Gregorova, S., Fotopulosova, V. & Forejt, J. (2008). Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics* **178**, 1777-1785.
- Vyskočilová, M., Trachtulec, Z., Forejt, J. & Piálek, J. (2005). Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 663-674.
- Wade, C. M., Kulbokas, E. J., Kirby, A. W., Zody, M. C., Mullikin, J. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K. & Daly, M. J. 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**, 574-578.
- Walling, G.A., Visscher, P.M. & Haley, C.S. (1998). A comparison of bootstrap methods to construct confidence intervals in QTL mapping. *Genetical Research* **71**, 171–180.
- Yoshiki, A., Moriwaki, K., Sakakura, T. & Kusakabe, M. (1993). Histological studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mouse strain. *Development, Growth and Differentiation* **35**, 271-281.

Table 1. Phenotypes of males from wild-derived Mmm strains STUF (F₁₀₋₁₈), STUS (F₈₋₁₂) and B10 and F₁ hybrid males from reciprocal crosses between the two Mmm strains and B10.

Order of parents			Mean testis	Left epididymis	Mean sperm
Female	Male	N	weight (mg)	weight (mg)	count (x 10 ⁶)
STUF	STUF	23	114.8 (10.9)	25.9 (2.5)	37.72 (4.53)
STUS	STUS	15	59.9 (7.1)	22.2 (2.6)	30.90 (6.38)
B10	B10	14	63.9 (6.2)	25.1 (1.8)	25.56 (6.25)
B10	STUF	9	106.5 (8.9)	28.0 (1.8)	39.22 (4.43)
STUF	B10	39	135.5 (9.2)	31.8 (2.6)	49.08 (6.53)
BL10	STUS	26	28.5 (2.5)	16.5 (1.5)	0.00 (0.00)
STUS	B10	18	33.1 (2.8)	15.1 (1.4)	0.00 (0.00)

Table 2. QTL-QTL interactions for phenotype traits in the (STUS x STUF) x B10 progeny. Positions of microsatellite markers were retrieved from the Mouse Genome Database of The Jackson Laboratory (www.informatics.jax.org). Chr1 and Chr2 - chromosome of the first and second interacting locus, respectively; Marker1 and Marker2 - markers for the first and second interacting locus, respectively; LRS - likelihood ratio statistic for the interaction as a whole; IX - LRS for the interaction effect; Main1 and Main2 - LRS for the main effects of the Chr1 and Chr2 loci, respectively.

Trait	Chr1	Marker1 (cM)	Chr2	Marker2 (cM)	LRS	IX	Main1	Main2
Sperm count	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	X	<i>DXMit131</i> (59.0)	131.0	13.6	109.2	6.0
Sperm count	10	<i>D10Mit75</i> (2.0)	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	114.1	12.3	2.4	102.8
Testis weight	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	18	<i>D18Mit149</i> (24.0)	92.9	10.3	84.7	3.9
Testis weight	10	<i>D10Mit75</i> (2.0)	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	93.9	8.3	1.1	85.4
Testis weight	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	X	<i>DXMit119</i> (29.5)	103.7	7.6	90.6	10.2
Epid. weight	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	X	<i>DXMit131</i> (59.0)	94.8	9.3	85.5	3.4
Epid. weight	10	<i>D10Mit55</i> (25.5)	17	<i>D17Mit43</i> (11.0)	90.6	7.5	1.7	81.2

Fig. 1. Histogram of mean sperm counts (A) and mean testis weights (B) in 74 males from (STUS × STUF) F_1 × B10 backcrosses. Twenty-five NSM (white bars) had no sperm and 15 FSM (gray bars) produced sporadic sperm in their epididymis (from 0.08 to 15.4 × 10⁶), the rest of progeny (FFM, black bars) displayed sperm numbers comparable with parental strains ranging from 25.2 to 59.7 × 10⁶. No gap was observed between the two most frequent peaks in distribution of mean testis weight. The NSM had mean testis weight within 31.7 - 53 mg, the FSM within 45 – 78.5 mg, and the FFM within 84.8 - 128.8 mg.

Fig. 1.

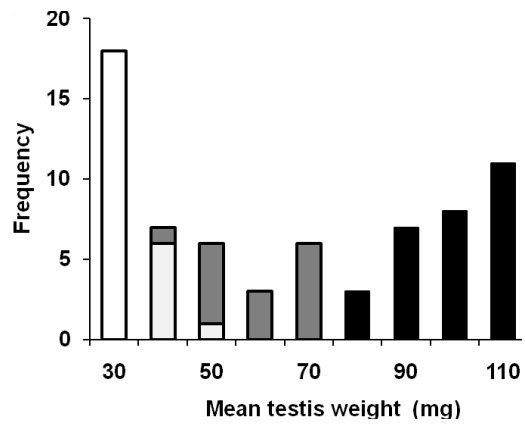
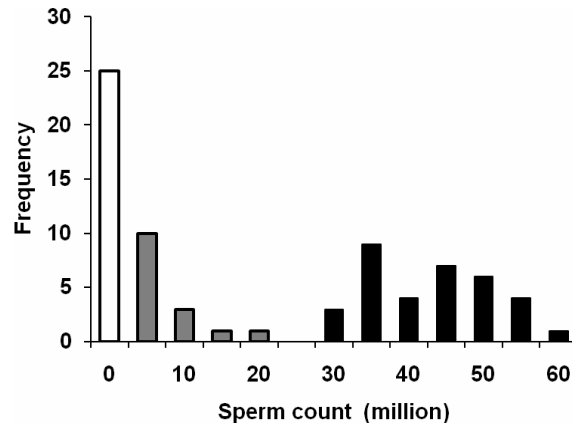


Fig. 2. Histological sections of the seminiferous tubules stained with hematoxylin-eosin observed in the NSM (A and B), FSM (C and D) and FFM (E and F). Gross histology is documented at 200x magnification in the left panels (A, C, and E). Details of spermatogenesis are displayed at 400x magnification in the right panels (B, D, and F). In A, seminiferous tubules were severely degenerated and hyperplasia of epithelial cells was observed in the interstitial spaces adjacent to disrupted tubules. In B, seminiferous tubules include a disintegrated germ cell layer with degenerated apoptotic primary spermatocytes indicated with white arrows. Black arrows point to phagocytosed germ cells. Note the absence of sperm in the lumen of tubules. In C, seminiferous tubules were moderately degenerated and characterized by thin and fragile epithelium with reduced numbers of germ cells. In D, male testes revealed disrupted integrity of the germ cell layer. Tubules contained normal spermatogonia and primary spermatocytes, degenerated round spermatids with acrosome defects and rarely elongating sperm heads. Arrows indicate apoptotic (white) and phagocytosed (black) spermatids. In E, seminiferous tubules of fertile males with normal spermatogenesis at various spermatogenic stages (F).

Fig. 2.

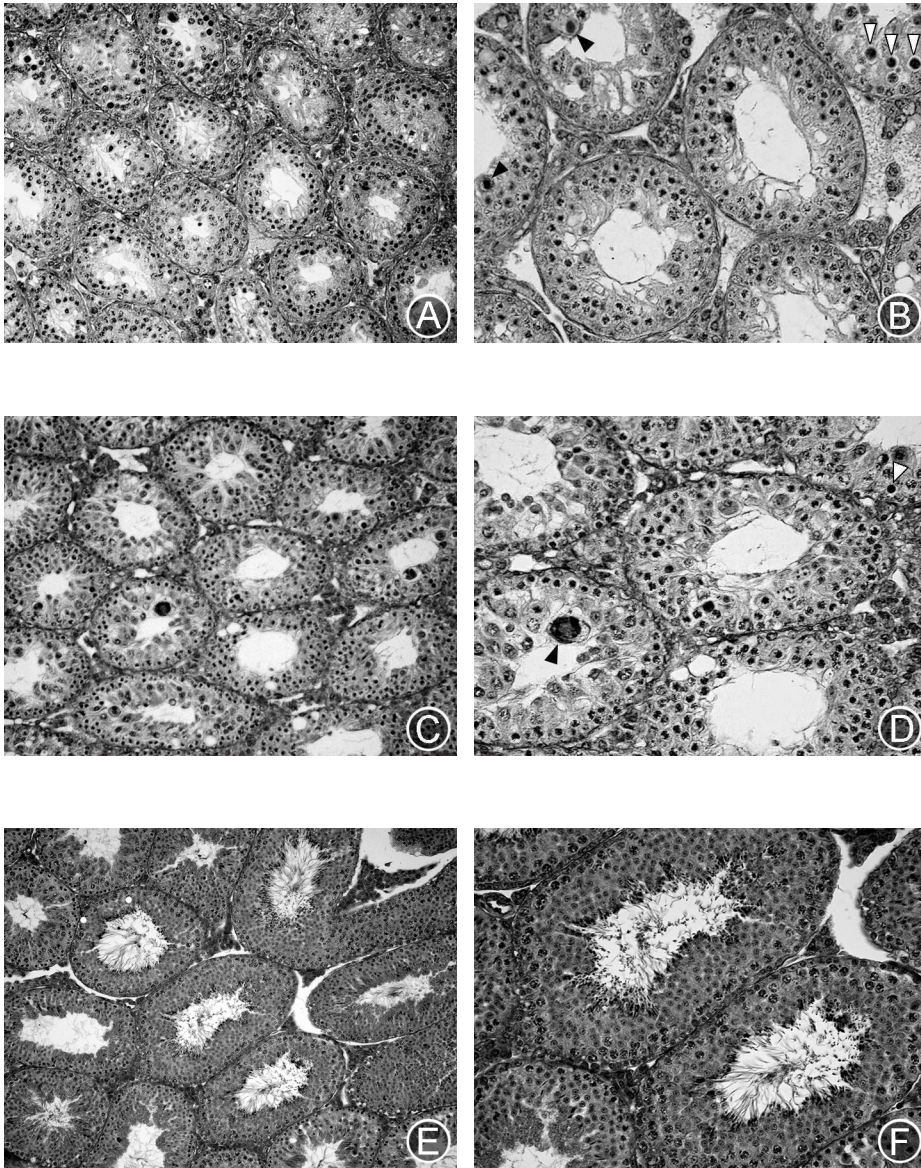


Fig. 3. QTL analysis of mean sperm count on Chr 17 (A), mean testis weight on Chr X (B), mean sperm count on Chr X (C), and epididymis weight on Chr 3 (D). LRS curves for the number of offspring were generated by MapManager QTX software. Solid lines indicate LRS threshold for suggestive linkage (significance value $\alpha = 0.63$); dashed lines, significant linkage ($\alpha = 0.05$); and dotted lines highly significant linkage ($\alpha = 0.001$). Histograms calculated by the bootstrap test show the confidence intervals for the particular QTLs on the chromosome. The positions of the microsatellites on the chromosomes represent recombination distances determined in this study, not from consensus map positions. The most proximal and most distal markers on Chr 17, at positions 13.8 Mbp (*D17CH07*) and 93.5 Mbp (*D17Mit123*) flank the full length of chromosome (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/ENSEMBL_v19.30.1). A comparison of the marker order with a consensus map of Chr 17 indicates that the markers are in the same order as markers in a consensus map. However, recombination is lower on this chromosome, making the whole map somewhat shorter. The most proximal and most distal markers on Chr X, at positions 6.9 Mbp (*DXmit55*) and 136.8 Mbp (*DXMit131*) flank almost the full length of the chromosome except the PAR region. The most proximal and most distal markers on Chr 3, at positions 26.8 Mbp (*D3Mit203*) and 119.5 Mbp (*D3Mit144*) flank the full length of chromosome.

Fig. 3.

