

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Безлепкина Светлана Алексеевна

**Элиминация одного из родительских геномов у гибридов зеленых
лягушек комплекса *Pelophylax esculentus***

Выпускная квалификационная работа обучающегося
по направлению подготовки: «Биология»
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена в лаборатории Структуры и
динамики клеточного ядра

Научный руководитель: к.б.н., м.н.с. лаборатории
структуры и динамики клеточного ядра
Дмитрий Викторович Дедух

Санкт-Петербург
2021

Оглавление

Введение.....	3
Обзор литературы.....	5
Диминуция хроматина.....	6
Диминуция хроматина у инфузорий.....	7
Диминуция хроматина у нематод.....	8
Диминуция хроматина у копепод.....	9
Диминуция хроматина у миксин.....	10
Диминуция хроматина у миног.....	11
Элиминация хромосом у птиц.....	12
Удаление генетического материала у межвидовых гибридов.....	13
Удаление генетического материала при гибридной стерильности и летальности.....	13
Преодоление гибридной стерильности посредством избирательного удаления генетического материала у растений.....	14
Преодоление гибридной стерильности посредством избирательного удаления генетического материала у межвидовых гибридов животных, размножающихся клонально.....	16
Состав и структура комплекса <i>Pelophylax esculentus</i>	19
Особенности кариотипов родительских видов и цитогенетические маркеры для их идентификации.....	20
Полиплоидные гибридные формы.....	22
Особенности воспроизводства гибридов в различных типах популяционных систем.....	23
Популяционные системы L-E типа.....	23
Популяционные системы R-E типа.....	23
Популяционные системы R-L-E типа.....	24
Популяционные системы E типа.....	24
Гаметогенез у родительских видов. Нормальный гаметогенез.....	25
Основные стадии оогенеза у родительских видов из комплекса зеленых лягушек.....	25
Основные стадии сперматогенеза у родительских видов из комплекса зеленых лягушек.....	27
Особенности гаметогенеза у <i>P. esculentus</i>	29
Предполагаемые механизмы элиминации генетического материала.....	30
Материалы и методы.....	32
Места отлова, объем выборок и локалитеты экспериментальных животных.....	32
Приготовление метафазных хромосом.....	33

Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация.....	33
Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация на препаратах хромосом.....	34
3D флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация.....	35
Флуоресцентная и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.....	36
Результаты.....	37
Адаптация протокола картирования повторяющейся последовательности, специфичной для генома <i>P. lessonae</i> с помощью флуоресцентной <i>in situ</i> гибридизации.....	37
Идентификация хромосом родительских видов во время метафазы мейоза в ходе деления сперматоцитов взрослых гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов.....	37
Идентификация хромосом родительских видов в клетках зародышевой линии во время раннего гаметогенеза у головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов с одним из родительских видов.....	39
Анализ морфологии гонад взрослых животных из разных популяционных систем.....	40
Обсуждение результатов.....	40
Идентификация хромосом обоих родительских видов с помощью видоспецифичных зондов.....	41
Элиминация одного из родительских геномов у гибридных самцов из популяционных систем L-E и R-E типов происходит премейотически.....	42
Элиминация одного из родительских геномов происходит в ходе раннего гаметогенеза головастиков, полученных от скрещивания гибридов из популяционных систем L-E и R-E типов.....	43
Элиминация генетического материала одного из родительских видов происходит на ранних стадиях онтогенеза гибридных головастиков и не происходит у взрослых гибридов.....	44
Выводы.....	45
Приложения.....	48
Список цитируемой литературы.....	57

Введение.

Программируемые геномные перестройки встречаются у достаточно широкого круга организмов, начиная с одноклеточных инфузорий и заканчивая позвоночными [Wang, Davis, 2014]. Такое широкое распространение свидетельствует о том, что механизмы удаления генетического материала возникали независимо в разных группах организмов. Эти процессы имеют большую функциональную важность для жизнедеятельности самых разнообразных живых существ. Программируемые геномные перестройки включают в себя рекомбинацию и перестройки генетического материала, например во время формирования разнообразных Т – клеточных рецепторов на поверхностях Т-лимфоцитов, а также более радикальный процесс удаления частей генома [Wang, Davis, 2014]. На данный момент выделяют два основных типа программируемого удаления генетического материала: диминуцию хроматина и элиминацию хромосом. При диминуции удаляются отдельные участки хромосом, при элиминации целые хромосомы. Диминуция хроматина и элиминация хромосом могут выполнять разные функции в организме, от участия в определении пола до радикального способа инактивации генов [Müller, Tobler, 2000a; Wang, Davis, 2014]. Изучение процессов элиминации генетического материала важно для расширения наших представлений о функционировании генома и о его роли в жизнедеятельности живых организмов. Помимо этого, эти знания могут найти практическое применение в разработке методов получения чистых линий в селекции растений и животных, а также лечении генетических заболеваний, связанных с увеличением числа хромосом (синдром Патау, синдром Дауна, синдром Эдвардса и др.).

Элиминация части генетического материала была обнаружена у некоторых межвидовых гибридов растений и животных. У гибридов животных элиминация одного из родительских геномов может проходить после оплодотворения. Кроме того, элиминация генома была обнаружена в ходе развития зародышевых клеток или во время мейоза. Такой способ реорганизации генетического материала позволяет преодолеть гибридную стерильность благодаря предотвращению конфликта хромосом разных родительских видов в мейозе. Помимо элиминации одного из родительских животных, в ходе гаметогенеза также может происходить и эндорепликация оставшегося генома. Это позволяет осуществить нормальный мейоз и сформировать гаплоидные гаметы. Такой способ воспроизводства был назван гибридогенезом [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009]. С помощью гибридогенеза воспроизводятся гибридные лягушки комплекса *Pelophylax esculentus*. Зеленые лягушки *Pelophylax esculentus* являются естественными гибридами двух родительских видов – *Pelophylax ridibundus* и *Pelophylax lessonae*. Вследствие гибридогенетического способа воспроизводства, гибридным лягушкам необходимо сосуществование с одним из родительских видов. В зависимости от того, с каким из родительских видов сосуществуют *P. esculentus*, выделяют популяции L-E (*P. lessonae* и *P. esculentus*) и R-E (*P. ridibundus* и *P. esculentus*) типов. Помимо этого, существуют популяции, в которых все три вида сосуществуют вместе, а также популяции, состоящие исключительно из гибридов различной ploidy.

Несмотря на продолжительное изучение гаметогенеза у гибридов в разных популяционных системах, особенности механизмов элиминации генетического материала одного из родительских видов в системах L-E и R-E типа еще не до конца изучены. На данный момент известно, что в популяционных системах L-E типа в гонадах гибридных головастиков происходит преимущественная элиминация генома *P. lessonae* и формирование гамет, содержащих геном *P. ridibundus*. В популяционных системах R-E типа гибридные лягушки элиминируют как генетический материал *P. ridibundus*, так и генетический материал *P. lessonae*. Таким образом, популяционные системы L-E и R-E типов различаются по способностям элиминировать геномы родительских видов и не являются симметричными. Изучение механизмов элиминации одного из родительских геномов у гибридов из различных локалитетов представляет актуальную задачу, так как позволяет расширить наши знания о механизмах удаления генетического материала и особенностях гибридогенетического способа воспроизводства.

На данный момент показано, что элиминация генетического материала одного из родительских видов происходит в гонадах головастиков посредством формирования микроядер [Dedukh и др., 2017]. Микроядра содержат отдельные хромосомы [Dedukh и др., 2019; Dedukh и др., 2020]. Предположительно, микроядра формируются посредством отставания отдельных хромосом во время анафазы митоза, вследствие не способности прикрепиться к веретену деления [Dedukh и др., 2020]. Кроме того, удаление хромосом может происходить посредством их отпочковывания из ядра на стадии интерфазы [Chmielewska и др., 2018]. Однако конкретные механизмы элиминации, а также особенности этого процесса в популяционных системах разных типов до сих пор не до конца изучены. Также не известно, протекают ли процессы элиминации у взрослых гибридов или они ограничены только ранним онтогенезом.

Для исследования элиминации и эндорепликации геномов необходимо применение цитогенетических маркеров, позволяющих надежно идентифицировать геномы обоих родительских видов. Идентификация генома *P. ridibundus* возможна благодаря использованию флуоресцентной *in situ* гибридизации с зондами к видоспецифичному перичентромерному повтору [Ragghianti и др., 1995]. Однако существующие цитогенетические маркеры для хромосом *P. lessonae* не позволяют идентифицировать хромосомы *P. lessonae* в клетках на стадии интерфазы [Dedukh et al., 2013]. Таким образом поиск надежных маркеров для идентификации генома *P. lessonae* необходим для изучения данного комплекса.

Целью данной работы является поиск возможных этапов элиминации и эндоредупликации генома одного из родительских видов у взрослых гибридных самцов и гибридных головастиков из популяций L-E и R-E типов комплекса *Pelophylax esculentus*.

Для достижения поставленной цели исследования были сформулированы следующие конкретные задачи:

1. Адаптировать протокол картирования повторяющейся последовательности, специфичной для генома *P. lessonae*, для метафазных мейотических и

митотических хромосом клеток зародышевой линии гибридных самцов с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

2. С помощью FISH идентифицировать хромосомы родительских видов во время метафазы мейоза в ходе деления сперматоцитов взрослых гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов для выявления особенностей процессов элиминации и эндоредупликации геномов у гибридов из разных популяционных систем.
3. С помощью 3D FISH провести анализ морфологии гонад взрослых гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов.
4. Идентифицировать хромосомы родительских видов и напрямую показать наличие хромосом *P. lessonae* в клетках зародышевой линии во время раннего гаметогенеза у головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов с одним из родительских видов.

Обзор литературы.

Одним из ключевых свойств генетического материала эукариотических организмов является его стабильность. Нарушения этой стабильности, вызванные стрессом, ионизирующим излучением, а также канцерогенной трансформацией могут приводить к удалению генетического материала [Fenech, 2010; Fenech, Crott, 2002]. Однако нарушения структурной стабильности генома могут происходить и при нормальном развитии организма. Одним из самых известных и наглядных примеров является соматическая рекомбинация, которая необходима для создания разнообразия TcR рецепторов на T-лимфоцитах и антител на поверхности B-лимфоцитов [Smithies, 1967].

Кроме перестроек [Austin, Trivers, 2009; Grishanin, Shekhovtsov, Bo\ui, ; Wang, Davis, 2014] и рекомбинации, у эукариот обнаружены и более радикальные методы изменения содержания ДНК в разных типах клеток, например, программируемое удаление ДНК [Austin, Trivers, 2009; Grishanin, Shekhovtsov, Bo\ui, ; Müller, Tobler, 2000a; Wang, Davis, 2014]. Программируемое удаление (или элиминация) ДНК описано у двух классов одноклеточных инфузорий, а также среди более 100 видов многоклеточных животных из девяти основных таксономических групп [Wang, Davis, 2014]. Элиминация генетического материала может выполнять разные функции, например, радикальную инактивацию генов посредством их удаления из клеток, а также регуляцию экспрессии генов. Однако одной из самых важных функций является регуляция активности ретротранспозонов. Кроме того, программируемое удаление ДНК выполняет функцию дозовой компенсации генов и определение пола у некоторых организмов [Austin, Trivers, 2009; Grishanin, Shekhovtsov, Bo\ui, ; Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020; Tobler, 1986; Wang, Davis, 2014]. На данный

момент известно два основных типа программируемого удаления ДНК: диминуция хроматина и элиминация целых хромосом. Главное отличие этих процессов состоит в том, что при диминуции хроматина происходит разрезание хромосом и удаление хромосомных фрагментов (в том числе и интерстициальных) [Müller, Tobler, 2000b; Wang, Davis, 2014]. Оставшиеся фрагменты хромосом либо формируют одну целую хромосому, либо становятся отдельными хромосомами, после достраивания к ним теломерных районов [Tobler, 1986; Wang и др., 2020; Wang, Davis, 2014]. При элиминации хромосом, происходит удаление целых хромосом, это могут быть В хромосомы и половые хромосомы [Austin, Trivers, 2009; Müller, Tobler, 2000a; Wang, Davis, 2014]. Кроме того, посредством удаления целых хромосом может происходить удаление хромосомных наборов, например, удаление отцовского генома при гаплодиплоидном определении пола у некоторых беспозвоночных [Austin, Trivers, 2009].

Программируемое удаление генетического материала независимо возникало у филогенетически отдаленных организмов. Механизмы этого процесса, которые в первую очередь связаны с типом элиминируемых последовательностей, разнообразны и до конца не изучены для разных групп, поэтому исследования по программируемому удалению ДНК, несомненно, представляют большой научный интерес.

Диминуция хроматина.

Диминуция хроматина была обнаружена у двух классов одноклеточных инфузорий (*Spirotrichea* и *Oligohymenophorea*), нескольких паразитических нематод, веслоногих рачков, а также некоторых позвоночных, американского гидролага, миксин и миног [Grishanin, Shekhovtsov, Волш, ; Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020; Wang, Davis, 2014]. У многоклеточных животных диминуция хроматина обнаружена только в соматических клетках во время раннего эмбрионального развития, в то время как в зародышевых клетках, генетический материал остается целостным и передается в гаметы [Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020; Wang, Davis, 2014]. У одноклеточных организмов диминуция хроматина происходит при формировании макронуклеуса, который активно транскрибируется на протяжении жизни инфузорий, являясь, таким образом функциональным аналогом соматических клеток у многоклеточных. Микронуклеус сохраняет целостность генетического материала и передает его во время полового процесса [Fang и др., 2012; Wang, Davis, 2014].

Диминуция хроматина выполняет функции дифференцировки и сегрегации клеток зародышевой линии и соматических клеток. Кроме того, диминуция хроматина влияет на экспрессию генов и регулирует количество гетерохроматина в предшественниках соматических клеток. Однако одной из наиболее важных функций диминуции хроматина является регулирование активности паразитических элементов, таких как ретротранспозоны в геномах эукариот [Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020; Wang, Davis, 2014].

Впервые, процесс диминуции был обнаружен более 130 лет назад Теодором Бовери, изучавшим расхождение хромосом во время раннего эмбриогенеза у паразитических нематод лошадей *Parascaris univalens* [Grishanin, Shekhovtsov, Bo\ui, ; Wang, Davis, 2014]. Эти нематоды характеризуются наличием одной большой пары хромосом зародышевой линии, значительным увеличением числа соматических хромосом и устранением более 85% генома зародышевой линии в соматических клетках [Müller, Tobler, 2000b]. Эти особенности способствовали открытию диминуции хроматина на данном объекте исследования. Вскоре после этого удаление ДНК было описано у нескольких других видов нематод, а затем у насекомых и других организмов [Grishanin, Shekhovtsov, Bo\ui, ; Wang, Davis, 2014].

Диминуция хроматина у инфузорий.

Инфузории представляют собой интереснейший объект для исследований программируемых перестроек генетического материала, так как во время формирования макронуклеуса при половом процессе они удаляют и перестраивают крупные участки своего генома [Prescott, 1994]. В разное время жизненного цикла одна клетка может содержать десятки, а у некоторых видов – сотни хромосом, поскольку геномы перестраиваются, деградируют, фрагментируются и амплифицируются до большого числа копий [Prescott, 1994]. Эти перестройки регулируются широким набором некодирующих РНК и белков [Fang и др., 2012; Mochizuki, 2010].

В 2002 году была открыта ключевая роль малых РНК-связывающих белков и связанных с ними РНК в процессах перестройки генома у *Tetrahymena* [Mochizuki и др., 2002]. В этой работе был открыт первый класс Piwi-ассоциированных малых РНК и показана их роль в удалении внутренних элиминированных последовательностей (internal eliminated sequences, IES) у *Tetrahymena*. На данный момент для *Tetrahymena* разработана модель удаления определенных последовательностей ДНК, опосредованного малыми сканирующими ДНК. Во время мейоза в родительских макронуклеусах РНК - полимеразы II синтезируют транскрипты с обеих нитей ДНК [Chalker, Yao, 2001]. Далее dicer-подобная рибонуклеаза (кодируемая DCL1) разрезает длинные транскрипты до коротких двухцепочечных РНК (~27-30 п.н.), называемых сканирующими РНК [Malone и др., 2005; Mochizuki, Gorovsky, 2005]. Сканирующие РНК переносятся в цитоплазму и, связываясь с белками семейства Аргонавт (Ago)(кодируются TWI1), образуют рибонуклеопротеиновые комплексы [Mochizuki и др., 2002]. Такие комплексы затем переносятся в родительский макронуклеус и сравниваются с возникающими некодирующими транскриптами из генома макронуклеуса. Сканирующие РНК, которые могут гомологично соединяться с транскриптами макронуклеуса (с последовательностями, предназначенными для макронуклеусов, MDS), разрушаются, и оставшийся набор сканирующих РНК теперь комплементарен IES макронуклеуса [Mochizuki и др., 2002]. Оставшиеся комплексы сканирующих РНК с белками семейства Аргонавт экспортируются в развивающийся новый макронуклеус и инициируют второй раунд процесса сканирования [Mochizuki и др., 2002], распознавая последовательности ДНК, которые впоследствии

гетерохроматинизируются и вырезаются белками транспозазами. После распознавания последовательностей, предназначенных для элиминации, происходит их гетерохроматинизация и последующее вырезание транспозазами [Mochizuki, 2010].

Любопытно, что представитель другого филогенетически довольно отдаленного класса инфузорий *Oxytricha* обладает принципиально иным механизмом реорганизации генетического материала [Fang и др., 2012]. Здесь важную роль играют РНК, ассоциированные с белками семейства Piwi (пиРНК). В отличие от сканирующих РНК у *Tetrahymena*, пиРНК и выполняют функцию «защиты» распознаваемых участков генома от элиминации. Предшественники пиРНК у *Oxytricha* формируются в старом макронуклеусе в результате транскрипции с белок кодирующих последовательностей, после процессинга они переходят в формирующийся новый макронуклеус, где распознают последовательности, предназначенные для сохранения. У *Oxytricha* сохраняемые последовательности, предназначенные для макронуклеуса, составляют всего 10% генома. У *Tetrahymena* удаляемые последовательности составляют 30% генома [Fang и др., 2012].

Диминуция хроматина у нематод.

К 2001 году наличие диминуции хроматина было показано для 11 паразитических видов нематод [Müller, Tobler, 2000a; Wang, Davis, 2014]. Интересно, что среди свободноживущих нематод диминуция хроматина не была обнаружена, однако она присутствует у вида, комбинирующего паразитические и свободноживущие стадии жизненного цикла (*Strongyloides papillosus*) [Streit и др., 2016]. При этом диминуция у *S. papillosus* происходит во время митотического партеногенеза, дающего начало свободноживущим самцам. В случае *S. papillosus* диминуция хроматина служит механизмом определения пола. В случае удаления фрагмента хромосомы возникают самцы. Если же геном остается неизменным, то из яйцеклеток развиваются партеногенетические самки [Nemetschke и др., 2010].

Наиболее полно процесс диминуции у нематод описан для *Parascaris univalens* (equorum) и *Ascaris suum*. Из пресоматических клеток *Parascaris* удаляется до 88% ДНК, у *Ascaris* до 25% [Kloc, Zagrodzinska, 2001; Müller, Tobler, 2000a]. У *Ascaris suum* диминуция происходит во время третьего-пятого деления (стадия от 4 до 16 клеток) раннего развития в пяти различных предшественниках соматических клеток. При диминуции во время митозов в соматических клетках-предшественниках хромосомы разрушаются. Фрагменты, которые будут удаляться, остаются в экваториальной части клетки во время анафазы и не расходятся к дочерним клеткам. Удаления хромосомных фрагментов не происходит в клетках зародышевой линии и их геном остается неизменным [Müller, Tobler, 2000a]. У данных видов нематод хромосомы являются голоцентрическими, что подразумевает формирование кинетохора по всей длине хромосомы. Однако, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что содержание центромерного варианта гистона H3 (CENP-A) уменьшается в хромосомных участках *Ascaris suum*, которым предстоит подвергнуться диминуции [Kang и др., 2016]. Снижение CENP-A

приводит к нарушению формирования кинетохоров на удаляемых участках хромосом, что препятствует прикреплению микротрубочек, необходимых для сегрегации хромосом, и приводит к потере ДНК во время анафазы митоза [Kang и др., 2016].

Удаляемые последовательности в основном представлены высоко повторяющимися и умеренно повторяющимися повторами [Müller, Tobler, 2000a]. Кроме того, Wang и др. [Wang и др., 2012] обнаружили, что помимо высокоповторяющихся последовательностей у *Ascaris suum* диминуции также подвергаются не менее 685 однокопийных последовательностей, экспрессирующихся в клетках зародышевой линии. Из этого можно предположить, что диминуция выполняет роль инактивации генов, необходимых для гаметогенеза в предшественниках соматических клеток [Wang и др., 2012].

У *P. univalens* диминуция хроматина происходит последовательно со 2-го по 6-е деление дробления у предшественников соматических клеток. Центральные эухроматические области хромосом у предшественников соматических клеток фрагментируются на несколько маленьких хромосом, которые разделяются на два дочерних ядра, тогда как крупные гетерохроматические концы остаются в цитоплазме, где в конечном итоге деградируют. Во время следующих раундов делений клеток диминуция повторяется еще четыре раза. Все клетки, подвергающиеся диминуции хроматина и, следовательно, содержащие меньше ДНК, становятся соматическими клетками, тогда как ядра, сохраняющие исходную целостность всех хромосом и исходное количество хроматина, дают начало клеткам зародышевой линии [Müller, Tobler, 2000].

Диминуция хроматина у копепоид.

Диминуция хроматина была обнаружена у 7 видов циклопов и у *Acanthocyclops vernalis*. Диминуция хроматина у копепоид, подобно нематодам, происходит на раннем этапе дробления и приводит к удалению большей части гетерохроматина из предшественников соматических клеток [Beermann, 1977; Grishanin, Shekhovtsov, Волш,]. Сравнение содержания ДНК в соматических и половых клетках показало, что около 50% ДНК удаляется из соматических клеток [Kloc, Zagrodzinska, 2001], а время диминуции хроматина у *Cyclops kolensis* геном клеток соматической линии реорганизуется и уменьшается в размере более чем на 90% [Grishanin, Zagoskin, 2018].

Диминуция хроматина у *C. kolensis* происходит во время 4-го деления дробления в 6-й и 8-й клетках и начинается в 7-й клетке, когда 6 клеток входят в 5-е деление. 8-я клетка, которая является предшественницей клеток зародышевой линии, не подвергается диминуции. До диминуции в клетках *C. kolensis* находится 11 пар хромосом длиной 11-20 мкм и шириной 0,8-1 мкм. После диминуции число хромосом не меняется, но их размер резко уменьшается до 2,6–7 мкм в длину и 0,2–0,3 мкм в ширину [Grishanin, Zagoskin, 2018].

Характерной чертой делений дробления у *Cyclops kolensis* является наличие большого количества плотно окрашенных гранул, содержащих ДНК, что было выявлено с помощью окрашивания по Фельгену. Эти гранулы впервые появляются во время поздней интерфазы и ранней профазы 4-го деления дробления. Анализ содержимого гранул показал, что находящаяся в них ДНК содержит высококонсервативные некодирующие АТ-богатые последовательности [Grishanin, Zagoskin, 2018]. Также некоторые удаляемые последовательности могут быть последовательностями, кодирующими мобильные генетические элементы из подсемейства ретротранспозонов Gypsy и некоторые гены рибосомных РНК [Grishanin, Zagoskin, 2018]. Предполагается, что удаление мобильных участков ДНК необходимо для их инактивации и предотвращает их чрезмерное распространение в геноме. Одно из возможных объяснений диминуции рибосомной ДНК состоит в том, что большое количество копий генов рибосомных РНК требуется только в гаметогенезе и на ранних стадиях развития, но не выполняет никаких функций на более поздних стадиях развития и дифференцировки соматических клеток. Другое возможное объяснение заключается в том, что диминуции подвергаются только неактивные гетерохроматинизированные копии рибосомной ДНК, которые были инактивированы вставками мобильных элементов [Grishanin, Zagoskin, 2018].

Диминуция хроматина у миксин.

Впервые диминуция хроматина у миксин (*Eptatretus burgeri*) была показана в исследовании 1986 года. Авторы проанализировали хромосомы на стадии метафазы в сперматогониях, первичных сперматоцитах и в четырех соматических тканях (кровь, печень, жабры и почки) [Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020]. В сперматогониях и первичных сперматоцитах было обнаружено 52 хромосомы, в то время как в соматических клетках самок и самцов было обнаружено только 36 хромосом. Согласно этим наблюдениям, было сделано предположение, что из соматических тканей удаляется 8 пар хромосом.

На данный момент показано, что восемь видов миксин, относящихся к двум семействам (*Eptatretidae* и *Muxinidae*), удаляют часть своего генома из предшественников соматических клеток. Таким образом, программируемое удаление ДНК происходит у всех изученных на сегодняшний день видов миксин [Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020].

Для некоторых видов миксин показано, что удаляемые хромосомы обогащены гетерохроматином. Так, хромосомы, интенсивно окрашиваемые в результате С-бэндинга, присутствуют только в клетках зародышевой линии, но отсутствуют в соматических клетках. Например, у *E. burgeri* обнаружено 8 пар хромосом, интенсивно окрашиваемых в результате С-бэндинга, что в точности соответствует количеству удаленных пар хромосом. Учитывая, что гетерохроматин, окрашиваемый в результате С-бэндинга, полностью отсутствует в соматических клетках, предполагается, что именно хромосомы,

обогащенные гетерохроматином, являются целями программируемой элиминации у этого вида [Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020].

У других видов хромосом, окрашиваемых С-бэндингом меньше, чем элиминируемых хромосом, что позволяет предположить, что также могут удаляться и некоторые С-бэндинг отрицательные хромосомы. Так, например для многих видов миксин (*E. okinoseanus*, *E. cirrhatus*, *E. stoutii*, *M. garmani* и *P. sheni*) показано наличие гетерохроматина на концевых участках метафазных хромосом зародышевой линии [Goto, Kubota, Kohno, 1998; Kojima и др., 2010; Kubota и др., 1993; Kubota и др., 1994]. Предполагается, что помимо целых хромосом, у миксин также удаляются субтеломерные районы некоторых хромосом.

Также у миксин были идентифицированы фракции высоко повторяющихся последовательностей ДНК, присутствующие в геномах клеток зародышевой линии, но отсутствующие в геномах соматических клеток [Kojima и др., 2010; Kubota и др., 1993]. Проведенный рестрикционный ферментный анализ соматической ДНК и ДНК клеток зародышевой линии позволил выявить два семейства последовательностей, характерных для зародышевой линии: EEEo1 (for Eliminated Element of *E. okinoseanus* 1) и EEEo2 (for Eliminated Element of *E. okinoseanus* 2). Затем фрагменты последовательностей EEEo1 и EEEo2 использовались в качестве зондов для проведения флуоресцентной *in situ* гибридизации на соматических метафазах и метафазах зародышевой линии *E. okinoseanus*. Флуоресцентные сигналы от EEEo1 и EEEo2 наблюдались в метафазах зародышевой линии *E. okinoseanus*, но не наблюдались ни в одной из соматических метафаз [Kubota и др., 1993].

Диминуция хроматина у миног.

Открытие программируемых геномных перестроек у морской миноги было сделано сравнительно недавно в результате Саузерн-блота последовательностей клеток зародышевой линии и соматических клеток [Smith и др., 2009]. Набор повторяющихся последовательностей был помечен радиоактивной меткой и гибридизирован с ДНК крови и ДНК спермы одной и той же особи. Эти гибридизации выявили последовательности ДНК, которые присутствовали только в клетках зародышевой линии. Один из фрагментов, размером ~ 10 т.п.н., названный Germ1, был клонирован, помечен и гибридизирован как с соматическими хромосомами, так и с хромосомами зародышевой линии. Полученные гибридизации показали несколько сильных сигналов ($N = 8$) в метафазе мейоза I клеток зародышевой линии и только пару сигналов в митотических метафазных клетках, изолированных из жаберного эпителия [Smith и др., 2009].

У морской миноги *Petromyzon marinus* удаление генетического материала начинается в первой половине шестого клеточного деления из предшественников соматических клеток [Timoshevskiy и др., 2016]. Удаление целых хромосом и хромосомных фрагментов

происходит во время анафазы митоза. К полюсам расходятся только хромосомы, специфичные для соматических клеток, которые впоследствии окружаются ядерной оболочкой, в то время как другие хромосомы и их фрагменты остаются в экваториальной части клетки. Этот хроматин в конечном итоге конденсируется с образованием небольших округлых микроядер. Микроядра обогащаются триметилированным H3K9me3 и впоследствии накапливают 5 метилцитозин [Timoshevskiy и др., 2016]. На этом этапе развития ядерный хроматин не обогащен 5-метилцитозином. После накопления меток метилирования, элиминированная ДНК подвергается фрагментации и в конечном итоге деградирует внутри клетки, так что очень небольшая часть специфической ДНК зародышевой линии обнаруживается на четвертый день развития [Timoshevskiy и др., 2016].

Элиминация хромосом у птиц.

Программируемые перестройки генетического материала включают удаление дополнительных или В хромосом. В хромосомы широко распространены среди животных и обнаружены в разных группах, в том числе и среди позвоночных [Austin, Trivers, 2009]. Одним из наиболее изученных примеров удаления В хромосом является удаление хромосом, специфичных для клеток зародышевой линии (GRC) [Austin, Trivers, 2009; Smith, Timoshevskiy, Saraceno, 2020]. Среди птиц такие хромосомы были впервые обнаружены у зебровой амадины [Pigozzi, Solari, 1998]. Эта хромосома была обнаружена в клетках зародышевой линии самок и самцов, однако она отсутствовала в соматических клетках. Эта хромосома произошла от В хромосомы, однако в отличие от В хромосомы, она содержит гены, необходимые для гаметогенеза [Schoenmakers и др., 2010; Pigozzi, Solari, 1998; Pigozzi, Solari, 2005]. Эта хромосома передается только через гаметы самок, а во время мейоза самцов происходит ее элиминация. Интересно, что у самок обнаружено две В хромосомы, а у самцов только одна. Перед элиминацией у самцов хромосома, специфичная для клеток зародышевой линии, накапливает модификации гистонов, характерные для гетерохроматина [Schoenmakers и др., 2010; Pigozzi, Solari, 1998; Pigozzi, Solari, 2005]. Во время профазы мейоза она становится гипофосфорилированной по гистону H3S10, что свидетельствует о нарушении формирования метафазной хромосомы. Кроме того, было обнаружено нарушение загрузки центрального гистона INCENP, что, вероятно, препятствует формированию кинетохора и ведет к элиминации этой хромосомы в ходе первого деления мейоза [Del Priore, Pigozzi, 2014; Goday, Pigozzi, 2010]. После элиминации эта хромосома формирует микроядро и деградирует [Schoenmakers и др., 2010].

В недавних исследованиях [Torgasheva и др., 2019] было показано, что несмотря на крупные гетерохроматиновые блоки, ограниченные клетками зародышевой линией хромосомы птиц транскрипционно активны. Также в результате секвенирования было обнаружено, что ограниченные зародышевой линией хромосомы птиц постепенно

накапливали гены, необходимые для эмбриогенеза и раннего эмбрионального развития [Torgasheva и др., 2019].

На сегодняшний день наиболее полный список генов, кодируемых хромосомами зародышевой линии, был составлен с использованием технологии 10-кратного одномолекулярного секвенирования генома [Kinsella и др., 2019]. Этот анализ показал, что дополнительная хромосома зебровой амадины содержит более 115 генов, которые являются паралогами однокопийным генам на 18 соматических аутосомах и Z-хромосоме. Некоторые из этих генов амплифицируются на хромосомах, ограниченных зародышевой линией. Среди этих генов транскрипция была обнаружена для 6 в семенниках и 32 в яичниках.

Открытие хромосом, ограниченных зародышевой линией, у зебровых амадин вдохновило на поиск похожих хромосом у других видов птиц. Вторым видом, у которого были идентифицированы эти хромосомы, была японская амадина (*Lonchura striata domestica*), близкий родственник зебровой амадины [Del Priore, Pigozzi, 2014]. Обширное сравнительное цитогенетическое исследование кариотипов зародышевых клеток 24 видов птиц, представляющих 8 порядков, показало, что ограниченные зародышевой линией хромосомы присутствуют во всех основных группах воробьиных птиц [Torgasheva и др., 2019].

Удаление генетического материала у межвидовых гибридов.

Удаление генетического материала при гибридной стерильности и летальности.

Большая часть межвидовых гибридов либо нежизнеспособна, либо стерильна в результате действия механизмов постзиготической репродуктивной изоляции. Так, например, гибриды, полученные при оплодотворении яиц *Xenopus tropicalis* спермой *Xenopus laevis* погибают еще до гаструляции. Примечательно, что гибриды, полученные в ходе возвратных скрещиваний, жизнеспособны [Bürki, 1985; Narbonne, Simpson, Gurdon, 2011]. В исследовании 2018 года [Gibeaux и др., 2018] было показано, что хромосомы *X. laevis* несовместимы с цитоплазмой *X. tropicalis*. Хромосомы *X. laevis* неправильно расходятся во время митотических анафаз, что приводит к изменению профиля экспрессии собственных генов зародыша. В результате такой зародыш погибает [Gibeaux и др., 2018]. Авторы данного исследования предполагают, что нежизнеспособность этих гибридов может быть связана с дивергенцией центромерных последовательностей, которые плохо охарактеризованы у *Xenopus*, но, как известно, быстро эволюционируют, или с дивергенцией других неидентифицированных повторяющихся элементов ДНК. Дивергенция этих элементов может приводить к нарушениям сборки кинетохора на нерасходящихся хромосомах, что, в свою очередь, является причиной нарушений расхождения хромосом.

Известны также и механизмы, связанные с гибридной стерильностью у жизнеспособных гибридных особей. У позвоночных наиболее частым случаем постзиготической репродуктивной изоляции является нарушение сперматогенеза у межвидовых гибридов первого поколения [Laurie, Bryan, Snape, 1997]. Нарушение сперматогенеза зачастую характеризуется уменьшенным количеством половых клеток и маленьким размером семенников. Несовместимость при воспроизводстве этих межвидовых гибридов в основном вызвана различием в кариотипах и / или структурах хромосом родительских видов [Borodin и др., 2011; Torgasheva, Borodin, 2016]. В исследовании сперматогенеза у гибридов домашней (*Anas platyrhynchos*) и мускусной (*Cairina moschata*) уток было показано, что большая часть сперматоцитов задерживается в пахитене первого мейотического деления, лишь малая часть доходит до диакинеза, где затем также задерживается [Islam и др., 2013]. Такие сперматоциты подвергаются элиминации посредством апоптоза, что приводит к серьезным нарушениям сперматогенеза у гибридных самцов. Авторы предполагают, что остановка мейоза в пахитене может быть вызвана нарушением конъюгации ортологичных хромосом в мейозе.

Однако, некоторые гибридные животные способны преодолевать гибридную стерильность за счет удаления генетического материала одного из родителей. Такие процессы характерны для многих гибридов растений и некоторых гибридов животных.

Преодоление гибридной стерильности посредством избирательного удаления генетического материала у растений.

Элиминация генетического материала у растений представляет особый интерес для исследователей в связи с возможностью практического применения этих знаний для получения искусственных гаплоидов и удвоения оставшегося генома для получения чистых линий культурных видов растений. Применение метода искусственной гаплоидизации, при котором гаплоидов получают из диплоидов, а затем удваивают оставшийся гаплоидный геном, позволяет получать гомозиготные линии без длительной фазы инбридинга [Ishii, Karimi-Ashtiyani, Houben, 2016]. На данный момент в основном используется два метода продуцирования гаплоидов. Культивируемые гаметофитные клетки могут быть выращены в гаплоидное растение, но этот метод применим далеко не ко всем видам и генотипам. Второй метод заключается в межвидовом скрещивании, в котором после оплодотворения один из родительских геномов элиминируется [Ishii, Karimi-Ashtiyani, Houben, 2016]. Минус этого метода заключается в том, что для него довольно сложно подобрать родительские виды так, чтобы происходила элиминация [Ravi, Chan, 2010]. Многие исследования в сфере элиминации ДНК у растений сконцентрированы на поисках индукторов гаплоидизации. Одним из потенциальных кандидатов на эту роль является центромерный гистон CENH3. В недавних исследованиях, проведенных на эмбрионах межвидовых гибридов *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* (культурный и дикий виды ячменя) был идентифицирован вариант центромерного гистона H3, известный как CENH3, различающийся у обоих видов [Sanei и др., 2011]. В отличие от классических гистонов, CENH3 быстро эволюционирует и

различается даже у близкородственных видов. Предполагается, что инактивация центромер на хромосомах одного из родительских видов приводит к элиминации этих хромосом. У нестабильных гибридов *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* в ходе раннего развития последовательно элиминируются хромосомы *H. bulbosum*, что приводит к формированию гаплоидного эмбриона с хромосомами *H. vulgare*. У нестабильных гибридов, хромосомы *H. bulbosum* отстают в анафазе из-за неактивности центромер, впоследствии формируя микроядра. Хроматин *H. bulbosum*, заключенный в микроядра, будет деградировать, в результате развивающийся гаплоидный эмбрион будет нести только генетический материал *H. vulgare*. Анализ образующихся во время элиминации микроядер показал повышенный уровень содержания H3K9me2 в сравнении с нормальными ядрами. Следовательно, транскрипционная активность хроматина в микроядрах сильно снижена [Sanei и др., 2011].

Хромосомы *Hordeum vulgare* характеризуются нормальной загрузкой гистона CENH3 в центромерные районы, что обуславливает правильную сборку кинетохора и расхождение этих хромосом. В то же время CENH3 не загружается в центромерные районы хромосом *H. bulbosum*, что приводит к их элиминации посредством постепенного отставания в серии митотических делений. Удаление хромосом *H. bulbosum* происходит не сразу, а после нескольких делений зиготы. Это связано с тем, что CENH3, полученный из центромер хромосом *H. vulgare*, поступивших после оплодотворения, вероятно, обеспечивает функцию остаточного кинетохора для хромосом *H. bulbosum*. Однако, когда его количество падает ниже критического порога, хромосомы *H. bulbosum* не могут прикрепиться к веретену деления и начинают элиминироваться. Интересно, что у гибридов происходит транскрипция обоих вариантов этого гистона, однако, вероятно, нарушается именно его загрузка в центромеры хромосом *H. bulbosum*. Регуляция загрузки и сборки CENH3 в центромере обеспечивается множеством белков, неисправность в работе любого из которых может привести к нарушению функционирования центромер на хромосомах *H. bulbosum* [Sanei и др., 2011]. У нестабильных гибридов хромосомы *H. bulbosum* отстают в анафазе из-за неактивности центромер, впоследствии формируя микроядра. В конце концов, микронуклеированный хроматин *H. bulbosum* будет деградировать, в результате развивающийся гаплоидный эмбрион будет нести только генетический материал *H. vulgare*. Микроядра накапливают маркеры гетерохроматина, и деградируют. Если гибридов *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* выращивать при пониженной температуре, то элиминации генетического материала одного из родительских видов не происходит. Считается, что это обусловлено работой шаперонов, которые помогают загрузить CENH3 в центромерные районы хромосом обоих родительских видов [Sanei и др., 2011].

Помимо отставания хромосом в анафазе, был обнаружен еще один возможный механизм удаления генетического материала. В исследовании гибридов пшеницы (*Triticum aestivum*) и африканского просо (*Pennisetum glaucum*) показано удаление не только посредством отставания, но и в результате почкования хроматина отдельных хромосом из ядра во время интерфазы [Gernand и др., 2006]. В данном исследовании авторы также показали,

что микроядра содержат либо только гетерохроматинизированную ДНК, либо гетерохроматин с небольшим количеством эухроматина. Также с помощью ник-концевого мечения dUTP (метод TUNEL) была показана интенсивная фрагментация ДНК в микроядрах [Gernand и др., 2006]

В работе 2010 [Ravi, Chan, 2010] года авторам удалось показать, что манипуляции с CENH3 приводят к образованию гаплоидов при скрещивании *Arabidopsis thaliana*. Для скрещиваний использовались растения дикого типа *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующие нормальный CENH3 и мутантные растения, экспрессирующие измененный CENH3. У гибридов, полученных в результате таких скрещиваний, происходит элиминация хромосом, несущих мутантный ген, таким образом формируется гаплоидное потомство. Интересным является то, что гаплоиды, полученные в результате таких скрещиваний, могли спонтанно переходить в диплоидное состояние. Гаплоиды, содержащие материнские или отцовские хромосомы могут быть получены в результате изменения родителя, несущего видоизмененный CENH3 [Ravi, Chan, 2010].

Преодоление гибридной стерильности посредством избирательного удаления генетического материала у межвидовых гибридов животных, размножающихся клонально.

У всех эукариотических организмов присутствует мейотический цикл, связанный со сменой поколений и процессами репродукции. Организмы, которые вторично изменяют обычный мейотический цикл, называют асексуальными или клональными [Schön, Martens, Dijk van, 2009]. Эти изменения могут происходить либо в раннем гаметогенезе, либо во время мейоза, или даже после оплодотворения, и приводят к формированию клональных или полуклональных типов гамет. У позвоночных животных, такие изменения гаметогенеза или раннего онтогенеза обычно связаны с межвидовой гибридизацией. Такие организмы воспроизводятся с помощью других способов воспроизводства, отличающихся от полового размножения, таких как партеногенез, гиногенез, андрогенез, клептогенез и гибридогенез [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009].

Партеногенез и гиногенез.

Наиболее распространенным способом клонального воспроизводства является партеногенез, встречающийся у самых разнообразных организмов от коловраток до пресмыкающихся. При партеногенезе развитие эмбриона происходит из неоплодотворенной яйцеклетки с набором хромосом идентичным хромосомному набору матери. В основе формирования таких яйцеклеток могут лежать разные механизмы. При аутомиктическом партеногенезе яйцеклетка восстанавливает диплоидность за счет слияния с другими продуктами мейоза. Кроме того, дупликация геномов зародышевых клеток перед мейозом также может приводить к формированию диплоидных яйцеклеток. При апомиктическом или митотическом партеногенезе яйцеклетки образуются

посредством митоза, количество хромосом при этом остается неизменным. Таким образом, потомство представляет собой настоящие клоны, генетически идентичные материнскому организму [Schön, Martens, Dijk van, 2009]. Также к партеногенезу относят гиногенез (или зависимый от сперматозоидов партеногенез). Гиногенез представляет собой тип воспроизводства, при котором для начала развития эмбриона необходима активация яйцеклетки сперматозоидом, при этом слияния ядер гамет не происходит. При этом типе воспроизводства яйцеклетка также содержит набор хромосом, идентичный хромосомному набору матери. После оплодотворения генетический материал сперматозоида полностью элиминируется. Естественное возникновение партеногенеза было зарегистрировано у многих позвоночных, среди которых большинство имеет гибридную природу (хлыстохвостые ящерицы, несколько видов гекконов, скальные ящерицы, агамы и др.), но также встречается и у видов не гибридной природы, комодских варанов, молотоголовых акул, а также гадюк [Schön, Martens, Dijk van, 2009].

Один из классических примеров не зависящего от сперматозоидов партеногенеза среди позвоночных был обнаружен среди однополых ящериц из рода *Aspidoscelis*. Этот род включает множество видов, которые интенсивно гибридизируются между собой, вызывая тем самым возникновение более чем 10 гибридных форм разной пloidности (2n, 3n, 4n). Диплоидные, триплоидные и тетраплоидные гибридные формы посредством премейотической дупликации генома зародышевых клеток производят яйцеклетки с таким же набором хромосом, что и материнская особь. Премейотическая эндорепликация позволяет гаметам пройти мейоз, однако рекомбинация происходит только между дублированными копиями хромосом. В результате образующиеся яйцеклетки несут такой же хромосомный набор, что и соматические клетки. Эти яйцеклетки развиваются без участия сперматозоидов в клональное потомство, генетически идентичное материнским организмам [Dawley, Bogart, 1989].

Другим изученным партеногенетическим комплексом являются кавказские партеногенетические скальные ящерицы из рода *Darevskia*. В этот комплекс входят несколько родительских видов и около 7 диплоидных гибридных форм. В отличие от ящериц из рода *Aspidoscelis*, восстановление диплоидного хромосомного набора в яйцеклетке у *Darevskia* происходит во время мейоза. Геном одного из родительских видов переходит в полярное тельце и затем сливается с яйцеклеткой. Яйцеклетки развиваются без участия сперматозоидов [Spangenberg и др., 2020].

Гиногенетический способ воспроизводства, широко распространен у рыб. Впервые этот способ воспроизводства был открыт у рыб *Poecilia formosa*. *Poecilia formosa* являются гибридами двух родительских видов *P. latipinna* и *P. mexicana*. Однополая *P. formosa* продуцирует диплоидные яйцеклетки, не претерпевающие рекомбинацию и обладающие хромосомным набором, идентичным соматическим клеткам матери. Яйцеклетки *P. formosa* нуждаются в сперматозоидах самцов близкородственных видов для активации развития. По-видимому, сперматозоид проникает в яйцеклетку, но слияния ядер сперматозоида и яйцеклетки не происходит и сперматозоиды не приносят генетического вклада в потомство. [Dawley, Bogart, 1989]. Удаление генетического материала

сперматозоида необходимо при развитии гиногенетических организмов, так как препятствует увеличению уровня пloidности. На гиногенетических рыбах из рода *Carassius* и *Cobitis* было показано, что хроматин сперматозоидов при воспроизводстве гибридов остается конденсированным и не претерпевает декомпактизации, в отличие от хроматина сперматозоидов родительских видов [Zhang и др., 2015]. Кроме того, после оплодотворения в отцовском хроматине у гиногенетических форм из рода *Carassius* не был обнаружен комплекс ремоделирования хроматина, отвечающий за разгрузку протаминов и загрузку гистонов [Zhao и др., 2011]. При этом у родительских видов, размножающихся половым путем этот комплекс присутствует.

Андрогенез.

Помимо партеногенеза, в природе встречается и другой тип однополого воспроизводства, связанный с развитием новых организмов исключительно на основе генетического материала отцовской особи. При андрогенезе самец является единственным источником ядерного генетического материала эмбриона. В природе встречаются два типа андрогенеза. При андрогенезе первого типа самки откладывают яйца без ядра, а эмбрион развивается из мужской гаметы после оплодотворения. Другой тип андрогенеза характеризуется слиянием мужских и женских гаметы с образованием зиготы, но при этом женский геном удаляется. Оба типа андрогенеза требуют диплоидизации отцовского генома или способности гаметы развиваться и выживать в виде гаплоидного самца. Хотя андрогенез в природе встречается редко, он регулярно встречается в некоторых природных популяциях, включая моллюсков рода *Corbicula*, хвойных деревьев, некоторых муравьев и палочников. Андрогенез также спорадически наблюдается у некоторых видов, особенно у перепончатокрылых (муравьи, пчелы и осы), а также у некоторых однодольных, двудольных и голосеменных [Schwander, Oldroyd, 2016].

Одним из наиболее изученных случаев андрогенеза являются процессы, происходящие в ходе гаметогенеза у моллюсков из рода *Corbicula*. После оплодотворения диплоидным или полиплоидным сперматозоидом, материнский ядерный геном удаляется из ооцита через два полярных тельца, так что единственный сохраняемый материнский генетический материал находится в митохондриях. Диплоидные или полиплоидные сперматозоиды имеют то же содержание ДНК, что и соматические клетки самца, и, предположительно, возникают в результате амейотического процесса, детали которого неизвестны [Schwander, Oldroyd, 2016].

Клептогенез.

Клептогенезом называют способ воспроизводства, при котором самки одного вида, представленного исключительно самками, используют сперму самцов симпатрических видов, представленных особями обоих полов. Сперма самцов симпатрических видов используется для активации развития нередуцированной яйцеклетки, но, в отличие от гиногенеза, геном самца может включаться в нередуцированную яйцеклетку или

использоваться для увеличения ее плоидности. Такой тип воспроизводства характерен для однополых амбистом [Bogart и др., 2009].

Гибридогенез.

Гибридогенетический способ воспроизводства характерен для межвидовых гибридов и встречается у некоторых диплоидных гибридов рыб (род *Poeciliopsis*, а также *Misgurnus anguillicaudatus*), земноводных (род *Pelophylax*, ранее *Rana*, род *Bufo*) [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009]. При гибридогенезе в гонадах гибридов при формировании гамет происходит селективная элиминация генетического материала одного из родительских видов и последующее удвоение сохранившегося генома, который затем претерпевает мейотическое деление. Удаление генома одного из родительских видов помогает гибридам избежать конфликта хромосом разных генотипов во время мейоза, из-за которого многие межвидовые гибриды являются стерильными. В результате формируются гонады, содержащие нерекombинированный генетический материал одного из родительских видов. Гибридность восстанавливается после слияния такой гаметы с комплементарным родительским видом [Bogart и др., 2009; Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009]. Таким образом, передача генетического материала в гаметы происходит клонально (без рекомбинации) [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009].

У межвидовых гибридов рыб из рода *Poeciliopsis* и триплоидных *Misgurnus anguillicaudatus* устранение одного из родительских геномов обычно происходит во время митоза или мейоза. Вероятнее всего элиминация связана с неспособностью хромосом одного из родительских видов прикрепляться к митотическому или мейотическому веретенуделению. У гибридных рыб из рода *Poeciliopsis* монополярные митотические веретена формируются в клетках зародышевой линии, и к ним могут прикрепляться только материнские хромосомы, отцовские же хромосомы остаются в цитоплазме. Хромосомы, не прикрепившиеся к нитям веретена и не разошедшиеся во время деления, деградируют [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009].

Состав и структура комплекса *Pelophylax esculentus*.

Комплекс средневропейских зеленых лягушек (род *Pelophylax*) включает приблизительно 16 видов и несколько форм с неустановленным систематическим статусом [Plötner, 2005; Lymberakis и др., 2007]. Зеленые лягушки ранее входили в состав рода *Rana*, но потом были выделены в отдельный род *Pelophylax* [Frost и др., 2006]. Кроме родительских видов в этот комплекс входят несколько гибридных форм, три из которых воспроизводятся посредством гибридогенеза. *Pelophylax hispanicus* Bonaparte населяет территории Италии и Сицилии и является гибридом *P. bergeri* и *P. ridibundus*. *Pelophylax grafi* Crochet обитает на территории Франции и является результатом скрещиваний *P. perezi* и *P. ridibundus* [Plötner 2005]. Самой распространенной гибридогенетической

формой являются *P. esculentus*, представляющие собой гибридов *P. ridibundus* и *P. lessonae*.

Комплекс зеленых лягушек *Pelophylax esculentus* состоит из двух родительских видов: озёрной лягушки *P. ridibundus* (RR генотип, $2n = 26$), прудовой лягушки *P. lessonae* (LL генотип, $2n = 26$), а также их естественного гибрида съедобной лягушки *P. esculentus*, включающей диплоидные (RL генотип, $2n = 26$), триплоидные (RRL и LLR, $3n=39$), а также редкие тетраплоидные формы (RRLR, $4n=52$). Особенностью этого комплекса является его широкое распространение и массовое возникновение гибридных животных, в том числе и полиплоидных, которые даже могут образовывать общие популяционные системы без участия родительских видов. Гибриды имеют широкий ареал обитания от Франции на западе до Волги на востоке, но внутри ареала распространены неравномерно. *P. esculentus* весьма многочисленны в Центральной Европе, но редки в восточных и южных ареалах родительских видов [Dedukh и др., 2019]. В восточной части ареала, *P. esculentus* многочисленны только в некоторых ограниченных местообитаниях.

В ходе воспроизводства у диплоидных гибридов происходит удаление генетического материала одного из родительских видов из предшественников половых клеток. После удаления одного из родительских геномов, оставшийся геном претерпевает эндорепликацию и передается в гаметы [Bogart, 1989; Schön, Martens, Dijk van, 2009]. Интересно, что удаление одного из родительских геномов зависит от родительского вида, с которым сосуществует гибридная форма.

Несмотря на то, что родительские виды занимают разные экологические ниши и существенно отличаются по морфологическим признакам, они способны населять одни и те же местообитания, а во время нереста, а в репродуктивный сезон, они могут образовывать общие группы размножения, что приводит к их гибридизации и совместному воспроизводству [Plötner 2005].

Особенности кариотипов родительских видов и цитогенетические маркеры для их идентификации.

Кариотипы двух родительских видов имеют довольно большое морфологическое сходство. Для всех видов диплоидный набор хромосом равен 26 и состоит из 5 пар крупных хромосом и 8 пар более мелких хромосом. При С-бэндинге (метод дифференциального окрашивания для выявления участков гетерохроматина) кариотипы трех видов можно различить по различным комбинациям светлых и темных полос на хромосомах, в частности по хромосоме №11. У *P. lessonae* короткое плечо этой хромосомы имеет С-бэндинг положительную полосу гетерохроматина, этот маркер всегда гомозиготен. Подобных маркеров не было найдено у особей *P. ridibundus*, хромосома №11 которых не содержит гетерохроматин, окрашиваемый в результате С-бэндинга. У *P. esculentus* одна из гомологичных хромосом №11 имеет маркер в виде полосы гетерохроматина, а вторая не содержит окрашиваемого гетерохроматина [Heppich, 1978].

Кроме того, идентификация хромосом родительских видов чрезвычайно затруднена вследствие высокого уровня полиморфизма хромосом родительских видов из различных популяционных систем.

Для *P. ridibundus* характерно интенсивное окрашивание центромерных областей при С-бэндинге и при флуоресцентном окрашивании (AMD/DAPI). При применении С-бэндинга и флуоресцентного окрашивания на хромосомах *P. lessonae* центромерные области не выделялись столь ярко [Bucci и др., 1990]. Область ядрышкового организатора у обоих видов выявляется на длинном плече X хромосомы после обработки хромомицином А3. С помощью С-бэндинга и флуоресцентного окрашивания удалось определить, что соматические митотические клетки *P. esculentus* содержат хромосомы *P. ridibundus* с более темными или интенсивно флуоресцирующими центромерными областями и хромосомы *P. lessonae* с более светлыми или вообще неокрашенными центромерами. Так же, как у обоих родительских видов, хромомицин А3 выявляет зону ядрышкового организатора на длинных плечах обеих гомологичных хромосом [Bucci и др., 1990].

Исследования [Ragghianti и др., 1995] показали, что виды также различаются количеством тандемных центромерных повторов сателлитной ДНК, обозначенных как RrS1. Хромосомы *P. ridibundus* характеризуются обогащением этими повторами центромерных участков хромосом. Было показано, что RrS1 составляет около 2,5% генома *P. ridibundus* и может составлять всего 0,2% генома *P. lessonae* [Ragghianti и др., 1995]. Помимо *P. ridibundus* последовательность RrS1 присутствует у *P. kurtmuelleri* и *P. cf. bedriagae*, зеленых лягушек, населяющих территории возле Эгейского моря. Локализация RrS1 рядом с центромерами и наличие в этой последовательности регионов, схожих с CDE дрожжей и CENP-B боксом млекопитающих, дают основания предполагать вероятно важную роль RrS1 в организации работы центромер.

Кроме того, недавно были обнаружены различия в локализации интерстициальных сайтов теломерного повтора на ядрышкообразующей хромосоме обоих родительских видов [Dedukh и др., 2013]. Исследователи обнаружили, что на ядрышкообразующей хромосоме *P. lessonae* присутствует один сайт интерстициального теломерного повтора, в то время как на ортологичной хромосоме *P. ridibundus* было обнаружено 2 таких сайта. Также на хромосомах типа ламповых щеток было показано, что сайт интерстициального теломерного повтора значительно больше по размеру [Dedukh и др., 2013].

Применение методов геномной *in situ* гибридизации позволило идентифицировать геномы родительских видов, а также хромосомные наборы, передаваемые в сперматоцитах гибридных самцов [Doležálková и др., 2016]. Однако, применение этого метода сопряжено с рядом методологических трудностей и не всегда показывает надежный результат [Doležálková и др., 2016].

До настоящего времени надежная идентификация хромосом обоих родительских видов возможна только для хромосом типа ламповых щеток, полученных из растущих ооцитов.

В ряде исследований [Bucci и др., 1990; Dedukh и др., 2013] были сконструированы детальные цитологические карты хромосом типа ламповых щеток с указанием маркерных структур, занимающих видоспецифичное положение у *P. ridibundus* и *P. lessonae* (Bucci et al., 1990; Dedukh et al., 2013). Однако использование данного метода идентификации хромосом ограничено только растущими ооцитами на стадии диплотены.

Таким образом, поиск надежных цитогенетических маркеров, позволяющих идентифицировать хромосомы обоих родительских видов, представляет собой важную задачу.

Полиплоидные гибридные формы.

Помимо диплоидных форм, в естественных условиях обитания встречаются также две триплоидные (RRL и LLR, $3n = 39$) и даже тетраплоидные (RRL, $4n = 48$) формы *P. esculentus*. Гибридизация часто приводит к полиплоидии, так как наличие двух разных геномов в клетке ведет к различным нарушениям мейоза и, следовательно, к нередуцированным диплоидным гаметам. В ходе гаметогенеза триплоидных гибридных форм обычно происходит удаление того генома, который представлен одной копией в геноме триплоидов (L геном удаляется у RRL гибридов, R геном удаляется у LLR гибридов). Оставшиеся геномы без эндорепликации входят в мейоз и формируют гаплоидные гаметы. Существенное отличие гаметогенеза триплоидных форм от диплоидных заключается в том, в ходе их гаметогенеза происходит рекомбинация между гомологичными хромосомами [Christiansen, Reyer, 2009].

Было показано, что диплоидные самки *P. esculentus* могут производить нередуцированные яйцеклетки, в которых, тем не менее, будет происходить эндорепликация [Christiansen, Reyer, 2009; Dedukh и др., 2015]. Вероятно, именно этот процесс ведет к появлению триплоидных форм. Как правило, триплоидные гибриды производят гаплоидные гаметы с теми геномами, которые они несут в двух копиях, геном, представленный единственной копией, удаляется. Триплоиды с генотипом RRL из популяционной системы R-E типа удаляют геном *P. lessonae*, оставшийся геном *P. ridibundus* формирует биваленты без эндорепликации и может претерпевать нормальный мейоз для формирования гамет [Dedukh и др., 2015]. Также у триплоидных самок *P. esculentus* были обнаружены необычные ооциты с 13 бивалентами однокопийного генома, ооциты с 26 уни- или бивалентами, ооциты с 39 уни- или бивалентами и ооциты с бивалентами и унивалентами [Dedukh и др., 2015]. Наличие ооцитов с 39 бивалентами говорит о том, что во время гаметогенеза триплоидных самок также может происходить эндорепликация. Ооциты с 39 бивалентами характерны для триплоидных партеногенетических и гиногенетических триплоидных гибридов позвоночных, которые производят нередуцированные гаметы и могут развиваться без оплодотворения. При гибридогенетическом воспроизводстве зеленых лягушек оплодотворение необходимо, однако роль таких ооцитов в популяционных системах зеленых лягушек не известна.

Особенности воспроизводства гибридов в различных типах популяционных систем.

Популяционные системы L-E типа.

Популяционные системы, в которых гибридные *P. esculentus* сосуществуют с *P. lessonae* (системы L-E типа) являются наиболее многочисленными и распространенными в Центральной Европе. Отдельные популяции внутри системы L-E типа могут значительно отличаться по таким параметрам, как соотношение генотипов и полов. Например, доля гибридных форм в таких популяциях может варьировать от 5% до 95% [Plötner, 2005]. Помимо диплоидных гибридов в популяциях L-E типа могут встречаться триплоидные гибриды, а также мозаики с ди- и триплоидными клеточными линиями.

В большинстве популяций L-E типа гибриды воспроизводятся за счет скрещиваний между самцами *P. lessonae* и диплоидными самками *P. esculentus*, а также за счет скрещиваний между триплоидными LLR-самцами и диплоидными LR-самками. LR самцы, как правило, имеют нарушения репродуктивной функции и вносят малый вклад в потомство популяции [Plötner, 2005]. В популяциях с небольшим количеством или отсутствием триплоидных форм основным источником появления новых гибридов являются скрещивания диплоидных самок *P. esculentus* и самцов *P. lessonae*. В популяционных системах L-E типа большая часть диплоидных гибридов удаляет геном *P. lessonae* и передает геном *P. ridibundus* [Uzzell, Hotz, Berger, 1980].

Популяционные системы R-E типа.

Популяционные системы, в которых *P. esculentus* сосуществуют с *P. ridibundus* были обнаружены на территории Германии, Дании, Польши, Венгрии, Чехии, а также в Восточной Украине. Зачастую популяции R-E типа состоят из самцов и самок *P. ridibundus* и самцов *P. esculentus*. В таких популяциях самцы *P. esculentus* могут воспроизводиться только при скрещиваниях с самками *P. ridibundus*. Большинство самцов *P. esculentus* производят сперматозоиды, которые содержат L-геном, так что при скрещивании с самками *P. ridibundus* получаются диплоидные *P. esculentus*. Помимо этого, есть самцы *P. esculentus*, производящие только гаметы с R - геномом, а также самцы, производящие гаметы и R-, и L-типов. Одновременное производство двух типов гамет, гаплоидных сперматозоидов с геномом *P. ridibundus* и гаплоидных сперматозоидов с геномом *P. lessonae*, получило название гибридная амфиспермия [Vinogradov и др., 1990].

Наряду с популяциями, в которых *P. esculentus* представлены особями одного пола, также были найдены популяции, в которых *P. esculentus* представлена особями обоих полов и

популяции, где встречаются диплоидные и триплоидные гибриды. Доля триплоидных гибридов в таких популяциях также может сильно варьировать [Plötner, 2005]. Для популяционных систем R-E типа было показано, что диплоидные гибридные самцы и самки производят в основном гаплоидные гаметы, содержащие геном *P. ridibundus* и только небольшая часть гибридов производит гаметы с геномом *P. lessonae*. Помимо этого, многие диплоидные гибриды из систем R-E типа производят сперматозоиды и яйцеклетки двух типов с гаплоидным набором хромосом обоих родителей [Biriuk и др., 2016; Dedukh и др., 2017; Vinogradov и др., 1990]. Предполагается, что в системах R-E типа большинство диплоидных гибридов и триплоидных гибридов с генотипом LLR появляются за счет диплоидных самцов, продуцирующих сперматозоиды с геномом *P. lessonae* [Dedukh и др., 2017].

Популяционные системы R-L-E типа.

Популяционные системы, состоящие из всех трех видов, встречаются довольно редко. Они были обнаружены в Германии, Нидерландах, Чехии, Польше, Румынии, в северной части Сербии, Украине в Венгрии, а также юго-западной части России, республике Удмуртия, Нижнем Новгороде, Республике Марий Эл [Plötner, 2005]. Такие популяционные системы зачастую рассматриваются как временные, так как обычно в них происходит вытеснение одной из родительских форм. В подобных популяциях гибриды могут появляться как в результате скрещиваний родительских видов друг с другом, так и в результате гибридогенетических скрещиваний *P. esculentus* с одним из родительских видов, зачастую *P. lessonae* [Dedukh и др., 2019; O Svinin и др., 2021].

Популяционные системы E типа.

На данный момент популяционные системы, которые состоят исключительно из гибридных особей, описаны в Дании, Германии, Франции, Латвии, Нидерландах, Польше, Швеции, Чехии, Словакии, России, Украине и Белоруссии [Plötner, 2005]. Практически во всех подобных популяциях помимо диплоидных *P. esculentus* были обнаружены триплоидные гибриды. С помощью электрофоретических исследований белков и микросателлитного анализа было выяснено, что большинство триплоидов в популяциях диплоидных и триплоидных гибридов средневропейской территории имеют LLR геном. Популяции на западе Польше и на острове Бронхольм, судя по морфологическим данным, в основном содержат триплоидных гибридов с генотипом LRR [Plötner, 2005].

В гибридных популяциях наиболее частыми являются скрещивания между диплоидными LR-самками и триплоидными LLR-самцами, хотя возможны и другие комбинации. От скрещивания между LLR-самцами и LR-самками могут получаться как диплоидные, так и триплоидные LLR-особи, так как LLR-самцы образуют, как правило, гаплоидные L-гаметы, а диплоидные самки производят гаплоидные R- или диплоидные LR-гаметы

[Plötner, 2005]. Таким образом, в подобных популяциях LLR-самцы являются источниками L-генома и заменяют особей *P. lessonae*.

Триплоидные гибриды, LLR и LRR, позволяют популяциям *P. esculentus* существовать без родительских видов. На большой территории, охватывающей юг Швеции, Данию и север Германии, интенсивные исследования подтвердили отсутствие взрослых особей *P. lessonae* и *P. ridibundus* [Christiansen, 2009]. В этих популяциях LLR-лягушки обоих полов производят L-гаметы, а LRR-лягушки (в основном самки), производят R-гаметы. Поскольку у LLR-лягушек есть генетическая рекомбинация между двумя геномами L, а у LRR-лягушек между двумя геномами R, полностью гибридные популяции в целом обладают чем-то вроде сексуального процесса. Негибридные потомки LL и RR образуются в таких популяциях в каждом поколении, но исчезают из естественных водоемов во время личиночного развития. Таким образом, полностью гибридные популяции являются успешными, несмотря на отсутствие родительских видов.

Гаметогенез у родительских видов. Нормальный гаметогенез.

Гаметогенез амфибий включает в себя формирование сперматозоидов в семенных канальцах семенников и формирование яйцеклеток в яичниках самок. Гаметогенез начинается еще на ранних стадиях онтогенеза. У самцов формирование сперматозоидов происходит на протяжении всей жизни, у самок основная часть яйцеклеток формируются до метаморфоза. Для взрослых самок показано деление первичных оогониев, но возникшие в результате такого деления клетки не могут давать начало гаметам и дегенерируют [Ogielska и др., 2013].

Основные стадии оогенеза у родительских видов из комплекса зеленых лягушек.

В дифференцировке яичников родительских видов можно выделить 10 стадий: I – III, недифференцированные гонады; IV - половая дифференциация; V – появление первых групп мейоцитов; VI – появление первых ооцитов на стадии диплотены; VII – IX - увеличение количества ооцитов на стадии диплотены и уменьшение количества оогониев и групп клеток; X - полностью развитый яичник, состоящий из ооцитов на стадии диплотены с рудиментарными пятнами оогониев [Ogielska, Kotusz, 2004]. Стадии развития гонад с I по IV (стадия половой дифференциации), сходны между самками и самцами [Naczkiwicz, Ogielska, 2013; Ogielska, Kotusz, 2004].

На первой стадии развития гонады первичные половые клетки мигрируют из формирующейся кишки в гонадные гребни. Гонадные гребни образуются как две боковые складки мезотелия дорсальной кишки ниже мезонефроса. Первичные половые клетки располагаются внутри гребней в один или несколько рядов, а затем образуют группы. По сравнению с соматическими клетками формирующейся гонады, первичные зародышевые клетки имеют большие размеры и содержат включения желтка. Они митотически делятся,

при этом митоз сопровождается постепенной потерей желточных включений (желточный лизис) [Ogielska, Kotusz, 2004].

На второй стадии первичные зародышевые клетки продолжают делиться. После завершения желточного лизиса половые клетки называют первичными гониями, или оогониями в случае развития яичников. Первичные оогонии представляют собой отдельные клетки, также на этой стадии все еще присутствуют одиночные первичные половые клетки [Ogielska, Kotusz, 2004].

На третьей стадии соматические клетки наружного эпителия гонад интенсивно делятся и мигрируют в сторону центральной части гонадных гребней. Гонада теперь состоит из центрального ядра соматических клеток, заполняющих «первичную полость гонад» и коры, содержащей несколько первичных половых клеток и увеличивающееся число первичных оогоний. [Ogielska, Kotusz, 2004].

Начиная с четвертой стадии можно обнаружить самые ранние признаки половой дифференциации. Первичные оогонии характеризуются высокой митотической активностью. Некоторые из первичных оогоний входят в митотический цикл с неполным цитокинезом, образуя цитоплазматические мостики. Такие оогонии образуют группу (гнездо) вторичных оогониев. Гонимальные группы отделены от соседних групп и первичных оогониев слоем соматических префолликулярных клеток, которые не проникают между вторичными оогониями внутри самой группы [Ogielska, Kotusz, 2004].

На пятой стадии происходит дифференцировка самой проксимальной части яичника в жировое тело. Вторичные оогонии постепенно начинают входить в мейоз, и кора теперь состоит из первичных оогоний, групп вторичных оогоний и мейоцитов. Интересно, что целый кластер или группа вторичных оогоний входит в мейоз [Ogielska, Kotusz, 2004].

На шестой стадии яичник продолжает увеличиваться в размерах, жировое тело отчетливо выделяется и все больше отделяется от самой гонады. Появляются первые ооциты на стадии диплотены, уже не расположенные в группах. Префолликулярные клетки стенки группы пролиферируют и формируют фолликулярные клетки. Кора теперь состоит из ооцитов на стадии диплотены, групп мейоцитов, групп вторичных оогониев и самого внешнего слоя одиночных первичных оогоний [Ogielska, Kotusz, 2004].

Начиная с седьмой стадий рост яичников определяется главным образом увеличением количества и размера ооцитов на стадии диплотены, образующихся из групп мейоцитов. Ооциты на стадии пахитены организованы в группы, но когда такие ооциты переходят в диплотену, группы расформируются. Группы перестают существовать, давая начало отдельным ооцитам на стадии диплотены. Ооциты на стадии диплотены выступают в просвет яичника (вторичную полость) [Ogielska, Kotusz, 2004].

На восьмой-девятой стадии рост яичника продолжается за счет увеличения количества ооцитов на стадии диплотены, которые также увеличиваются в размерах. Жировое тело также разрастается и разделяется на несколько пальцевидных отростков. Первичные

оогонии располагаются только в уменьшающихся участках во внешних частях коры или в перегородках между долями яичников. Они по-прежнему пролиферируют, хотя скорость митотических делений снижается [Ogielska, Kotusz, 2004].

Десятая стадия соответствует полностью развитому яичнику. Кортекс почти полностью состоит из ооцитов на стадии диплотены. В ювенильных яичниках ооциты на стадии диплотены представлены только превителлогенетическими ооцитами, в то время как перед первой овуляцией у молодой самки лягушки кора состоит из диплотенных ооцитов, принадлежащих ко всем классам дифференцировки: превителлогенетическим, вителлогенетическими и зрелым. Самые маленькие ооциты расположены у самой внешней части коры, в то время как большие ооциты, примыкают к стенке полости яичника. Каждый ооцит на стадии диплотены окружен фолликулом, состоящим из слоя эпителиальных (фолликулярных) клеток, и текой, состоящей из соединительной ткани, волокон гладкомышечных клеток, мелких кровеносных сосудов и нервов. Первичные и вторичные оогонии ограничены самой внешней частью коры. Обычно они образуют группы, разбросанные по рыхлой соединительной ткани. Некоторые из этих групп представлены группами вторичных оогоний, которые соединены цитоплазматическими мостиками. Скопления клеток с ооцитами на стадии лептотены, зиготены и пахитены наблюдаются редко. Вторичные оогонии зрелого яичника представляют собой яйцевидные клетки с ядрами неправильной формы. На стадии зрелого яичника оогонии, собранные в группы, дегенерируют. [Ogielska, Kotusz, 2004]. В яичнике земноводных, как и млекопитающих, происходит дегенерация ранних диплотенных ооцитов. Предполагается, что это приводит к формированию определенного количества ооцитов, то есть служит механизмом контроля числа будущих яйцеклеток [Ogielska и др., 2010].

Данные последних исследований [Ogielska и др., 2013] противоречат с существовавшим ранее представлении о том, что из-за многочисленности откладываемой икры, в яичниках земноводных каждый сезон размножения происходит образование новых ооцитов. Первичные оогонии взрослых самок действительно могут пролиферировать, но такие клетки не будут вступать в мейоз и давать начало новым гаметам, так как они подвергаются дегенерации. Таким образом, окончательное количество ооцитов на стадии диплотены закладывается во время ювенильного периода и его хватает на всю дальнейшую жизнь самки [Ogielska и др., 2013].

Основные стадии сперматогенеза у родительских видов из комплекса зеленых лягушек.

На ранних стадиях развития (до метаморфоза) гонады обоих полов имеют идентичное строение. Семенники, так же, как и яичники, состоят из клеток зародышевой и соматической линий. Соматическая часть происходит из генитальных гребней, представляющих собой продольные складки целомического эпителия в дорсальной части полости тела. В генитальные гребни из энтодермы формирующейся кишки мигрируют

первичные половые клетки. Первичные половые клетки собираются внутри центральных частей половых гребней, так что их концы лишены половых клеток [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

Потомки эпителиальных клеток половых гребней образуют центральное ядро внутри недифференцированной гонады, тогда как половые клетки вместе с соседними соматическими клетками располагаются в корковом веществе (коре) гонады. Клетки, которые образовывали центральное ядро, дают начало семенным канальцам, сети семенника и выводным протокам будущего семенника (или фолликулярным клеткам будущего яичника). Фибробласты и кровеносные сосуды происходят из клеток, которые мигрируют из мезонефроса внутрь массы существующих мозговых клеток и размножаются там. В семеннике фибробласты дифференцируются в клетки Лейдига и вместе с коллагеновыми волокнами и другими соматическими клетками образуют интерстициальную ткань [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

Недифференцированные гонады самцов входят в стадию дифференцировки без какой-либо переходной фазы. Самые ранние морфологические признаки дифференцировки наблюдались у головастиков в возрасте от 4 до 5 недель (что соответствует 27–28 стадии эмбрионального развития по таблицам развития Госнера, [Gosner, 1960]). Первым гистологическим проявлением половой дифференцировки ранних семенников является перемещение гониальных клеток из коры недифференцированной гонады в центральное ядро. Бывшая кора в конечном итоге лишается половых клеток и дает начало белочной оболочке [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

Когда гонады уже дифференцированы по полу, среди первичных сперматогоний можно выделить два типа клеток: светлые и темные первичные сперматогонии. Светлые первичные сперматогонии характеризуются округлой формой, светлой цитоплазмой и светлыми ядрами, содержащими 2-5 ядрышек. Темные первичные сперматогонии меньше светлых, с более плотной цитоплазмой и пятнами гетерохроматина в ядрах [Bartmańska, Ogielska, 1999].

Вторичные сперматогонии организованы в клеточные ассоциации, стенки которых образованы соматическими клетками. Все вторичные сперматогонии в каждой клеточной ассоциации являются потомками одного первичного сперматогония, вероятно, темного типа. Клеточные циклы во всех сперматогониях одной ассоциации синхронизированы. После завершения митотических делений вторичные сперматогонии входят в мейоз и образуют ассоциации сперматоцитов I (лептотены / зиготены, пахитены и диплотены). Затем образуются сперматоциты II, имеющие меньший размер, чем сперматоциты I. Сперматиды это самые маленькие круглые клетки, расположенные близко к внутренней стенке клеточной ассоциации, при этом ее просвет остается пустым. Следующим этапом сперматогенеза является удлинение сперматид и образование сперматозоидов. Во время этой фазы сперматогенеза головки сперматозоидов все еще контактируют с внутренней стенкой клеточной ассоциации, а их хвосты направлены к ее центру. Созревшие

сперматозоиды выделяются из ассоциаций в просветы семенных долек [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

Семенники *P. lessonae* и *P. ridibundus* развиваются с примерно одинаковой скоростью. На 28-32 стадиях эмбрионального развития [Gosner, 1960] формируются будущие дольки семенников. Митотическая активность сперматогониев достаточно высокая, в поперечном срезе каждой дольки видны до 8 первичных сперматогониев. Каждый сперматогоний окружен 2-3 соматическими клетками. Первые бледные первичные сперматогонии были обнаружены на 30 стадии [Gosner, 1960]. Наружный эпителий семенников хорошо дифференцирован и между дольками можно заметить полости. На последующих стадиях количество будущих долек увеличивается до 10 на поперечном срезе. Иногда видны бледные сперматогонии с дольчатыми ядрами. Сперматогонии активно пролиферируют и их количество значительно возрастает. На стадии 36/37 [Gosner, 1960] у *P. lessonae* появляются первые темные первичные сперматогонии. В центре гонад соматические клетки образуют тяж, из которого в дальнейшем образуется сеть семенника (образована семенными канальцами). На стадии 38-41 [Gosner, 1960] гонада примерно вдвое больше, чем на стадии 33. Число долек увеличивается до 30 на поперечном срезе. Количество темных сперматогоний увеличивается и теперь больше, чем бледных. Во время метаморфоза (стадии 42-46 [Gosner, 1960]) все еще присутствуют как светлые, так и темные первичные сперматогонии. Как светлые, так и темные первичные сперматогонии представлены отдельными клетками, каждая из которых окружена соматическими клетками и иногда образует группы. Первые клеточные ассоциации с небольшим количеством вторичных сперматогоний видны на 44-45 стадиях развития головастиков [Gosner, 1960] [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

После метаморфоза и перед первой спячкой бледные первичные сперматогонии еще многочисленны и их митотическая активность высока. Они разбросаны среди ассоциаций, содержащих сперматоциты на стадиях лептотены/ зиготены и пахитены. Лишь немногие клеточные ассоциации содержат удлиненные сперматиды, сперматозоиды еще не наблюдаются [Naczkiwicz, Ogielska, 2013]. Летом семенники демонстрируют высокую митотическую активность бледных первичных сперматогоний. Наиболее многочисленные ассоциации содержат вторичные сперматогонии и сперматоциты на стадии лептотены/ зиготены. В семенниках перед зимней спячкой (сентябрь) все бледные первичные сперматогонии находятся на стадии интерфазы, а дольки заполнены клеточными ассоциациями, содержащими все стадии мейоза, в их просветах обнаруживаются сперматозоиды [Naczkiwicz, Ogielska, 2013].

Особенности гаметогенеза у *P. esculentus*.

Яичники *P. esculentus* задерживаются в дифференцировке минимум на 1 год. В это время кора яичников состоит из размножающихся первичных оогоний, которые удаляют один набор хромосом. Оставшийся набор дублируется, что делает возможным нормальное

прохождение мейоза. Семенники гибридных самцов также развиваются дольше, чем у родительских видов, в связи с различными осложнениями процессов элиминации и эндорепликации. Большинство клеток в составе семенников и яичников гибридов гибнут, так как не могут правильно завершить дупликацию сохраняемого генома.

После метаморфоза и до первой спячки семенники остаются небольшими с небольшим количеством светлых первичных сперматогоний. Темных сперматогоний не наблюдается. После первой спячки большинство половых клеток все еще остаются бледными первичными сперматогониями, и появляются первые клеточные ассоциации, содержащие вторичные сперматогонии. После второй спячки дольки заполнены клеточными ассоциациями, содержащими все стадии мейоза вплоть до сперматоцитов II. У половозрелых фертильных гибридов структура семенников аналогична описанной для родительских видов. В большинстве случаев размер гонад сопоставим с размерами гонад родительских видов [Bartmańska, Ogielska, 1999].

Предполагаемые механизмы элиминации генетического материала.

Особенность воспроизводства гибридов *P. esculentus* заключается в удалении одного из родительских геномов из клеток зародышевой линии перед мейотической рекомбинацией и дублированием (эндорепликации) оставшегося генома [Hg, S, 1981; Tunner, 1974]. Далее эндореплицированный геном входит в мейоз, однако рекомбинация происходит между идентичными копиями дублированных хромосом. В результате формируются гаплоидные гаметы, несущие геном одного родителя, передающийся клонально. Гибриды появляются в каждом поколении при скрещивании с тем родительским видом, геном которого был удален.

Во время гаметогенеза *P. esculentus* обоих полов в цитоплазме гоноцитов (первичных и вторичных оогониях и сперматогониях) были обнаружены микроядра [Ogielska, 1994]. Микроядра представляют собой специфические внеядерные структуры, морфологически похожие на основное ядро клетки, окруженные двойной ядерной мембраной и содержащие элиминированную ДНК. С помощью просвечивающей электронной микроскопии было установлено снижение количества комплексов ядерных пор в микроядрах по сравнению с нормальными ядрами [Chmielewska и др., 2018]. В недавнем исследовании [Dedukh и др., 2020] с помощью иммуноокрашивания антицентромерной сывороткой CREST против кинетохорных белков удалось выявить центромеры в подавляющем большинстве микроядер исследованных гибридных головастиков. Как правило, в каждом микроядре наблюдался сигнал от одной центромеры и только 4% микроядер были либо лишены центромеры, либо имели сигналы от двух или трех центромер. Вероятнее всего, удаление хромосомного набора одного из родительских видов ($n = 13$ хромосом) происходит постепенно посредством удаления одной хромосомы в одном микроядре. Таким образом, большинство гоноцитов анеуплоидны до тех пор,

пока не закончится элиминация всего хромосомного набора одного из родительских видов.

Предположительно микроядра образуются во время абберрантных митозов, во время которых хромосомы не могут прикрепиться к веретену деления. Хромосомы, не прикрепившиеся к нитям веретена деления располагаются вне метафазной пластинки во время митоза. Такие хромосомы, предположительно, отстают во время анафазы и не включаются в ядра после митотического деления [Chmielewska и др., 2018; Dedukh и др., 2020]. Таким образом, ядра зародышевых клеток являются анеуплоидными, до тех пор, пока не удалят гаплоидный набор хромосом. Также хромосомы, не прикрепившиеся к нитям веретена деления и отстающие во время анафазы наблюдаются с высокой частотой в присутствии стрессовых факторов [Fenech, 2010; Fenech, Crott, 2002]. На гибридах африканского просо (*Pennisetum glaucum*) и пшеницы мягкой (*Triticum aestivum*) был показан возможный механизм элиминации генетического материала одного из родительских видов во время митотических делений [Gernand и др., 2005]. На первой стадии митоз-зависимой элиминации элиминируемый хроматин занимает периферическое положение в ядре. Далее хромосомы удаляемого генома неправильно сегрегируются во время анафазы митоза либо из-за неправильного взаимодействия кинетохоров с нитями веретена деления, либо из-за присутствия дополнительной лишней центромеры на хромосоме, либо из-за отсутствия центромеры. В результате элиминируемые хромосомы не расходятся к полюсам клетки и формируют микроядра [Gernand и др., 2005].

Микроядра могут также возникать в интерфазе в результате отпочковывания от ядра [Ogielska, 1994; Chmielewska и др., 2018]. Благодаря анализу гоноцитов с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, удалось проследить несколько последовательных стадий отпочковывания элиминируемого материала от интерфазных ядер. Ранняя стадия образования микроядер представляет собой ядерные пузырьки, выступающие из основных интерфазных ядер. Содержимое таких пузырьков окрашивается DAPI и окружено ядерной оболочкой, показывающей слабый сигнал белков ядерных поровых комплексов. На следующем этапе почкования хроматин выступает из основного ядра, и отделяется от основного ядра мембраной, содержащей белки ядерного порового комплекса, формируя микроядро. В уже разделенных микроядрах уровень содержания белков ядерного порового комплекса снижается или же сигналы от них вообще отсутствуют [Chmielewska и др., 2018].

При иммунофлуоресцентном окрашивании гоноцитов родительских видов и гибридов с антителами к гистону H3, триметилированному по лизину 9 (H3K9me3, маркер гетерохроматина) наблюдалась более интенсивная флуоресценция в зоне микроядер. Интенсивность окрашивания хроматина в основных ядрах гоноцитов у родительских видов и у гибридов была сходной [Chmielewska и др., 2018], что свидетельствует о гетерохроматинизации генетического материала в микроядрах, по сравнению с ядрами зародышевых клеток.

При изучении морфологии гоноцитов с помощью просвечивающей электронной микроскопии, были обнаружены микроядра с различными признаками дегенерации. Наблюдалась пронизывание цитоплазмы двойными липидными мембранами, по-видимому, эндоплазматическим ретикулумом и кольцевидными пластинками, окружающими гетерохроматинизированные микроядра. Подобная морфология может отражать начальную стадию аутофагии. Иммунофлуоресцентное исследование с использованием ассоциированного с микротрубочками белка легкой цепи 3 (LC3) в качестве маркера образования аутофагосом показало, что преобладающая часть микроядер (76%) не имеет сигнала LC3. Тем не менее, в 10% всех наблюдаемых микроядер (9 из 68 проанализированных клеток) хроматин был декорирован агрегатами LC3, соответствующими мембраносвязанной форме LC3 [Chmielewska и др., 2018]. Агрегаты имели вид сильно выделяющихся точек, расположенных на периферии высококонденсированного хроматина в микроядрах или в виде сгустков на одной из их сторон. Эти наблюдения могут соответствовать стадии образования фагосом, а также дегенерации хроматина внутри микроядер.

Материалы и методы.

Места отлова, объем выборок и локалитеты экспериментальных животных.

Сбор материала был проведен в трех различных местообитаниях зеленых лягушек. Отлов зеленых лягушек был проведен в мае-июне 2019 – 2020 гг Д.В. Дедухом в сотрудничестве с А. О. Свининым (популяционные системы, расположенные в республике Марий Эл), а также Л. Холева (популяционные системы, расположенные в Чехии и Словакии). В ходе работы были отловлены особи родительских видов, а также гибриды из популяционных систем L-E типа, расположенных в республике Марий Эл и Словакии. Гибридные формы в этих популяционных системах представлены диплоидными гибридами обоих полов. Кроме того, был проведен отлов гибридов из популяционных систем R-E типа, расположенных на территории Чехии. В этих популяционных системах гибриды представлены исключительно диплоидными гибридными самцами.

Скрещивания были поставлены Д. В. Дедухом совместно с Л. Холева базе Института физиологии и генетики животных, Чехия. Всего было получено 9 успешных скрещиваний гибридов из популяционных систем R-E и L-E типов и особей *P. ridibundus* и *P. lessonae* соответственно. Отловленных животных содержали во влажном боксе и впоследствии использовали для экспериментов по скрещиванию *in vitro*. Самкам внутрибрюшинно один раз за 24 часа до изъятия гонад вводили 6,25 мг / кг массы тела лютеинизирующего релизинг-гормона лосося (LHRH, H-7525.0001, Bachem). Икру получали из самок и распределяли ее на несколько чашек Петри. Самцов подвергали эвтаназии для микродиссекции гонад. Перед эвтаназией животным путем подкожной инъекции вводили раствор колхицина (3г в 1 мл 1×PBS на каждое животное). Перед эвтаназией животных погружали в 1% растворе этилового эфира 3-аминобензойной кислоты. Семенники

разделяли на несколько частей, часть гомогенизировали и использовали для оплодотворения икры, оставшиеся части семенников фиксировали для последующего анализа хромосом и анализа интактных тканей. После изъятия гонады фиксировали фиксаторе 3:1 (3 объема этилового спирта:1 объем ледяной уксусной кислоты) для дальнейшего приготовления препаратов хромосом. Часть семенника фиксировали в 2% растворе PFA приготовленном на 1×растворе PBS для проведения 3D флуоресцентной *in situ* гибридизации и конфокальной микроскопии.

Стадии развития головастиков определяли в соответствии с таблицами развития, разработанными Госнером [Gosner, 1960]. Начиная со стадии 28 (питающийся головастик) до стадии 40 (начало метаморфоза), каждую неделю в случайном порядке отлавливали 3-10 головастиков из каждой кладки для последующего анализа гаметогенеза. Ткани гонад головастиков фиксировали в 2% растворе ПФА приготовленном на 1×растворе PBS.

Приготовление метафазных хромосом.

С целью изучения гаметогенеза взрослых самцов были изучены 16 гибридных самцов из систем L-E типа, расположенных в республике Марий Эл, 6 гибридных самцов из систем R-E типа, отловленных в Чехии и 5 гибридных самцов, полученных в результате лабораторных скрещиваний (система R-E типа).

Ткани кишечника и семенники помещали в гипотонический раствор на 25 минут, после чего переносили в фиксатор 3:1 (3 объема этанола:1 объем ледяной уксусной кислоты) на 30 минут. После двойной смены фиксатора ткани хранили для приготовления препаратов хромосом при температуре +4°C.

Фрагмент ткани фиксированной гонады суспензировали в 100 мкл предварительно приготовленного раствора 70% уксусной кислоты. Далее с помощью микропипетки суспензию раскапывали по препаратным стеклам, предварительно нагретым на нагревательном столике до 60°C. В процессе продвижения капли по стеклу раствор испарялся, а метафазные хромосомы и интерфазные ядра оставались на предметном стекле. Приготовленные препараты хранили для дальнейшей флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Зонды для флуоресцентной *in situ* гибридизации изготавливали и метили биотином и дигоксигенином с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномную ДНК *P. ridibundus* использовали для амплификации зонда RrS1, специфичного для центрального повтора *P. ridibundus*, со следующими праймерами к высокоповторяющейся центральной последовательности RrS1 [Ragghianti и др., 1995]:

прямой 5`-AAGCCGATTTTAGACAAGATTGC-3`;

обратный 5`-GGCSTTTGGTTACCAAATGC-3`.

Зонд RrS1 метился биотином.

Геномную ДНК *P. lessonae* использовали для получения зонда Ples289, специфичного для хромосом *P. lessonae*, со следующими праймерами к высокоповторяющейся центромерной последовательности Ples289:

прямой: 5`-TTTGGCTTCCAAGGGCCGGG-3`

обратный: 5`-TGACCAAAAACGACACTCCC-3`

Зонд Ples289 метился дигоксигенином.

Успешность прохождения ПЦР оценивалась с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенным бромидом этидия (EtBr) (Рис.5). В качестве маркера использовались маркеры длины ДНК GeneRuler (Thermo Fisher Scientific).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация на препаратах хромосом.

Предварительную обработку хромосом пепсином перед флуоресцентной *in situ* гибридизацией проводили только в одном эксперименте, так как она оказывала негативный эффект на качестве препаратов, разрушая хромосомы. Предварительную обработку пепсином начинали с погружения препаратов в раствор 1×PBS на 5 минут при комнатной температуре. Далее 100 мкл 0,01% раствора пепсина наносили на каждый препарат и препараты накрывали парафильмом. Накрытые препараты помещали в термостат с 37°C на 4-5 минут, после чего проводили отмывки 1×PBS на 10-15 минут, потсфиксацию в 2% ПФА, на 1×PBS на протяжении 10-15 минут, затем снова отмывки в 1×PBS.

После предварительной обработки на препараты наносили гибридизационную смесь. Проводились опыты с совместной и с отдельной денатурацией ДНК зондов и хромосомной ДНК на препаратах.

Совместная денатурация:

Состав гибридизационной смеси: 50% формамид, 10% декстран сульфат, 2×SSC, 5 нг/мкл меченные зонды (RrS1 – биотин, Ples289 – дигоксигенин) и 10–50-кратный избыток блокирующей ДНК (ДНК спермы лосося). 10 мкл гибридизационной смеси наносили на каждую половину стекла (20 мкл на стекло) и накрывали покровным стеклом 24×24 мм. Каждую половину стекла запечатывали под покровным стеклом с помощью резинового клея для денатурации и последующей гибридизации.

Совместную денатурацию проводили на нагревательном столике в течение 4 минут при 75°C. После совместной денатурации препараты помещали во влажную камеру и оставляли при комнатной температуре на ночь.

Для оптимизации протокола FISH с двумя зондами, мы также провели отдельную денатурацию, для улучшения морфологии хромосом и уменьшения неспецифического сигнала.

Для денатурации ДНК хромосом препараты помещали в предварительно нагретый до 75 °С раствор, содержащий 70% формамид и 2×SSC. Стаканчик с раствором и препаратами помещали в водяную баню при 75°С на 15 минут. После этого препараты последовательно проводили по ледяным растворам этилового спирта (50%, 70% и 96%), 5 минут в каждом спирте при -20 °С. Зонды в составе гибридизационной смеси (50% формамид, 10% декстран сульфат, 2×SSC, 5 нг/мкл меченные зонды (RrS1 – биотин, Ples289 – дигоксигенин) и 10–50-кратный избыток блокирующей ДНК (ДНК спермы лосося) денатурировали отдельно нагреванием при 95°С на протяжении 10 минут в амплификаторе C1000 (Bio Rad). После денатурации эппендорфы помещали в ледяной штатив. Далее гибридизационную смесь также наносили на препараты, запечатывали с помощью покровных стекол и резинового клея, и препараты оставляли на ночь во влажной камере при комнатной температуре.

Отмывки от не специфично связавшихся зондов проводили на следующий день. С препаратов аккуратно снимали резиновый клей и покровные стекла, далее препараты погружали в стаканчики с предварительно нагретым до 45°С раствором 0,2×SSC. Стаканчики с препаратами в растворе 0,2×SSC помещали в баню при 45°С и покачивании на 5 минут по три смены. После отмывок проводили детекцию зонда. 100 мкл растворов стрептавидина (Jackson Immuno Research Laboratories), в концентрации 1:200, связанного с флуорохромом Alexa488 для идентификации зонда RrS1 и антидигоксигенина, связанного с Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories) в концентрации 1:200 для идентификации зонда Ples289. Препараты покрывали парафильмом и оставляли на час в термостате при 37°С. Далее проводили отмывку от растворов стрептоидина и антидигоксигенина. Раствор 4×SSC в стаканчиках предварительно нагревали до 45°С в водяной бане. С препаратов снимали парафильм и помещали в стаканчики с раствором 4×SSC, далее стаканчики с препаратами и раствором помещали в водяную баню при 45°С и покачивании, три смены по 5 минут. После этого препараты последовательно обезвоживали в серии спиртов с повышающейся концентрацией (50%, 70% и 90%) по 3 минуты. После обезвоживания препараты высушивали при комнатной температуре и заключали DAPI (1 мкг/мкл) (Sigma), приготовленном в растворе фотопротектора (DABCO) для окрашивания хромосом.

3D флуоресцентная *in situ* гибридизация.

3D флуоресцентная *in situ* гибридизация проводилась Дедухом Д.В. Для гибридизации на тканях целых гонад взрослых гибридов и гибридных головастиков использовали зонды к центральному повтору RrS1 и повтору Ples289. Предварительно зафиксированные в 2% растворе параформальдегида на 1×PBS гонады хранили на +4°С в 1×PBS с добавлением 0,02% азида натрия.

Перед проведением гибридизации для улучшения проникновения зонда фрагменты гонад помещали в 1% раствор Triton X-100, сделанный на 1×PBS, при комнатной температуре на 4-5 часов. Отмывку от раствора Triton X-100 проводили в 1×PBS в течение 10 минут при

комнатной температуре. Предварительную обработку проводили в растворе 40% формамида, 10% декстран сульфата и 2×SSC в течение 3–4 часов при 37° С. После удаления раствора для предварительной обработки добавляли смесь для гибридизации (50% формамид, 10% декстран сульфат, 2×SSC, 5 нг / мкл меченого зонда (RtS1) и 10–50-кратный избыток блокирующей ДНК (сперма лосося/ДНК дрожжей)). Денатурация проводилась в течение 10 минут при 75°С. После эппендорфы оставлялись на покачивании при комнатной температуре примерно на 24 часа. Отмывки от неспецифически связавшегося зонда проводились в 0,2×SSC на 45°С. Для визуализации биотина использовался стрептавидин, связанный с Су3. Ткани окрашивали с использованием DAPI, разведенного в 1×PBS (1 мкг / мл), в течение 12-24 часов.

Перед наблюдением под конфокальным микроскопом ткани помещали на покровные стекла с каплей DAPI. Визуализацию проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Флуоресцентная и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Анализ препаратов проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Микроскоп оборудован объективами 10×/1, 20×/1, 40×/1 и 100×/1, тубусной оптикой с линзами 1.0×, 1.25×, 1.6×, монохромной цифровой камерой DFC350 FX, с соответствующими кубиками фильтров для флуорохромов Alexa 488, Су3 и DAPI (Leica Wetzlar GmbH, Германия). Для получения и обработки цветных изображений использовали программу LAS X CORE. Визуализацию проводили на флуоресцентном микроскопе в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Ткани гонад головастиков, а также взрослых гибридов погружали в каплю заключающей среды, содержащей фотопротектор (DABCO, Merck). Образцы анализировали при помощи системы для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии Leica TCS SP5 на базе инвертированного микроскопа Leica DMI 6000 CS (Leica-microsystems). Сканирование проводили в XYZ-плоскостях с использованием объектива HC PL APO 20×, 40×. Диодный, аргоновый и гелий-неоновый лазеры использовали для возбуждения флуоресцентного красителя DAPI, флуорохрома Alexa 488 и Су3 соответственно. Изображения совмещали при помощи компьютерной программы LAS AF (Leica-Microsystems, Германия).

Обработку и подсчет количества микроядер, а также флуоресцентного сигнала в клетках проводили в программе LAS AF (Leica-Microsystems).

Результаты.

Адаптация протокола картирования повторяющейся последовательности, специфичной для генома *P. lessonae* с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация с применением нового зонда Ples289 была проведена на препаратах метафазных митотических хромосом трех животных вида *P. ridibundus*, трех животных вида *P. lessonae* и трех животных вида *P. esculentus*. Новый зонд не гибридизуется с хромосомами *P. ridibundus*, гибридизуется с двумя парами хромосом *P. lessonae*: ядрышкообразующей 10-ой и акроцентрической 11-ой, содержащими повторяющуюся последовательность, характерную для этого генома, и гибридизуется с двумя хромосомами в клетках *P. esculentus*, соответствующими хромосомам *P. lessonae*. Также флуоресцентная *in situ* гибридизация с применением нового зонда была проведена на препаратах мейотических хромосом для идентификации хромосом родительских видов в ходе деления сперматоцитов взрослых гибридов. Для 16 взрослых самцов из популяционных систем L-E типа было проанализировано 285 микрофотографий метафазных мейотических хромосом. Для 11 взрослых самцов из популяционных систем L-E типа было проанализировано 158 микрофотографий метафазных мейотических хромосом. Подробные результаты данного анализа приведены в соответствующем разделе. Таким образом применение нового зонда позволяет надежно идентифицировать хромосомы *P. lessonae* в клетках зародышевой линии и соматических клетках гибридов. Также была проведена двуцветная 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация на участках тканей гонад гибридных головастика с применением зондов RrS1 для идентификации генетического материала *P. ridibundus* и Ples289 для идентификации генетического материала *P. lessonae*. Двуцветная 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация была проведена на гонадах 9 головастика, полученных в результате скрещиваний гибридов из популяционных систем R-E типа с одним из родительских видов и на гонаде 1 головастика, полученного в результате скрещиваний гибридов из популяционной системы L-E типа с одним из родительских видов. Применение нового зонда позволяет идентифицировать генетический материал *P. lessonae* в составе микроядер и клеток на стадии интерфазы, находящихся в составе гонад гибридных головастика.

Идентификация хромосом родительских видов во время метафазы мейоза в ходе деления сперматоцитов взрослых гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов.

Для идентификации сохраняемого во взрослых клетках генома была проведена флуоресцентная *in situ* гибридизация на мейотических хромосомах тканей гонад взрослых гибридных самцов. Было проанализировано 285 микрофотографий метафазных мейотических хромосом клеток гонад 16 взрослых гибридных самцов из популяционной системы L-E типа, расположенной в Республике Марий Эл. В ходе анализа хромосом в

метафазе мейоза I мы обнаружили, что все 16 самцов производят сперматоциты с 13 бивалентами, содержащими хромосомы *P. ridibundus*. Кроме того, у 13 из 16 проанализированных самцов в метафазе мейоза II мы обнаружили сперматоциты с 13 унивалентами, соответствующие хромосомам *P. ridibundus*. Мы можем заключить, что до начала мейоза I хромосомы *P. lessonae* удаляются из гониальных клеток. Оставшиеся хромосомы *P. ridibundus* эндоредуплицируются, формируя 13 бивалентов. Сперматоциты с 13 бивалентами могут пройти мейоз и сформировать гаметы с геномом *P. ridibundus*. Помимо этого, у 10 самцов формировались сперматоциты с 26 унивалентами с хромосомами обоих родительских видов. Сперматоциты с таким набором хромосом возникают при отсутствии процессов элиминации и эндоредупликации. Также нами были обнаружены сперматоциты с 26 бивалентами, с хромосомами *P. ridibundus* и *P. lessonae*. Сперматоциты с такими наборами формировались всего у двух животных. Наличие подобных сперматоцитов свидетельствует о прохождении эндоредупликации без элиминации.

Для анализа особенностей гаметогенеза у взрослых самцов из популяций R-E типа, расположенных в Чешской Республике и Словакии, было проанализировано 158 микрофотографий мейотических хромосом клеток гонад 11 взрослых гибридных самцов. В ходе анализа хромосом в метафазе мейоза I мы обнаружили, что 10 из 11 самцов формируют сперматоциты с 13 бивалентами. При этом пять самцов производили только сперматоциты с 13 бивалентами, представленными хромосомами *P. ridibundus*. Три самца производили сперматоциты с 13 бивалентами *P. ridibundus* и 13 бивалентами *P. lessonae*. Также мы обнаружили двух самцов, производивших только сперматоциты с 13 бивалентами *P. lessonae*. Помимо этого, 8 самцов формировали сперматоциты с 13 унивалентами. Из них три самца производили только сперматоциты с 13 унивалентами *P. ridibundus*, три самца производили только сперматоциты с 13 унивалентами *P. lessonae* и два самца производили сперматоциты с 13 унивалентами *P. ridibundus* и сперматоциты с 13 унивалентами *P. lessonae*. Таким образом, у взрослых гибридных самцов из популяций R-E типа происходит премейотическая элиминация хромосом разных родительских видов в разных популяциях зародышевых клеток. Сохранившиеся хромосомы также претерпевают эндоредупликацию и могут вступать в мейоз, формируя гаметы с геномами как *P. ridibundus*, так и *P. lessonae*. Также мы обнаружили, что у 8 взрослых гибридных самцов формируются сперматоциты с 26 унивалентами с хромосомами обоих родительских видов, что свидетельствует об отсутствии процессов элиминации и эндоредупликации. У пяти самцов формировались сперматоциты с 26 бивалентами с хромосомами обоих родительских видов, не претерпевшие элиминацию генетического материала одного из родительских видов, но прошедшие эндоредупликацию. Таким образом, гибридные самцы из популяционной системы R-E типа производят больше сперматоцитов с аберрантными наборами хромосом (с 26 унивалентами и бивалентами обоих родительских видов).

Идентификация хромосом родительских видов в клетках зародышевой линии во время раннего гаметогенеза у головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов с одним из родительских видов.

Для изучения элиминации одного из родительских геномов на тканях гонад гибридных головастиков была проведена 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация с двумя зондами для идентификации хромосом обоих родительских видов для гонад 9 самцов из популяционных систем R-E типа и для гонады одного самца из популяционной системы L-E типа. На участках тканей гонад 12 животных из популяционной системы L-E типа была проведена 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация только с зондом RrS1. Подсчет количества микроядер проводился для микрофотографий гонад 9 животных из систем R-E типа и для микрофотографий гонад 12 животных из системы L-E типа. Также для некоторых животных было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против тубулина для визуализации хромосом, не прикрепившихся к нитям веретена деления и отстающих хромосом. Были проанализированы конфокальные снимки гонад 12 головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяционных систем L-E типа с одним из родительских видов. Для головастиков, полученных в результате скрещиваний одного из родительских видов с *P. esculentus* из системы L-E типа из Республики Марий-Эл было проанализировано 7453 зародышевых клеток (гоноцитов), из них 1147 клеток имели одно или несколько микроядер (15,4% клеток имели микроядра). Сигнал от повтора RrS1 для идентификации генома *P. ridibundus* несли $10,8 + 0,65\%$ всех проанализированных микроядер. Такое небольшое количество микроядер с сигналами от повтора RrS1, характерного для хромосом *P. ridibundus*, свидетельствует о преобладающей элиминации генетического материала *P. lessonae* в гонадах гибридных головастиков из популяционных систем L-E типа. Помимо микроядер при анализе было обнаружено 39 хромосом, не прикрепившихся к нитям веретена деления во время метафазы митоза гониальных клеток. Кроме того, был обнаружен один случай отставания хромосом в анафазе митоза гониальных клеток. Из хромосом, не прикрепившихся к нитям веретена деления, $12,82 + 0,09\%$ несли сигналы от зонда RrS1. Таким образом, результаты по идентификации геномов в микроядрах совпадают с результатами, полученными при идентификации хромосом, не способных прикрепиться к веретену деления и отстающих хромосом.

Также были проанализированы конфокальные снимки 9-и головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяций R-E типа с одним из родительских видов. Для данных 9 головастиков проводилась двуцветная 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация с применением двух зондов для идентификации генетического материала обоих родительских видов. Для головастиков, полученных в результате скрещиваний *P. esculentus* из популяций R-E типа с одним из родительских видов, были проанализированы 4232 зародышевые клетки, из них 738 имели одно или несколько микроядер (более 17% клеток имели микроядра). Сигнал от зонда RrS1 для идентификации генома *P. ridibundus* несли более $37+0,2\%$ всех проанализированных микроядер. Количество микроядер с

сигналом *P. ridibundus* значительно выше у головастиков, полученных в результате скрещивания гибридов из популяционных систем R-E типа с одним из родительских видов, чем у головастиков, полученных от скрещивания гибридов из популяционной системы L-E типа с одним из родительских видов. Это свидетельствует о том, что у гибридных головастиков из популяционных систем R-E типа элиминация генетического материала *P. ridibundus* происходит более интенсивно, чем у головастиков из популяционных систем L-E типа. Помимо микроядер, в гонадах головастиков, полученных от скрещивания гибридов из популяционной системы L-E типа с одним из родительских видов, была обнаружена 1 хромосома, не прикрепившаяся к нитям веретена деления. Эта хромосома не несла сигнала от повтора RrS1 и потому, предположительно содержала генетический материал *P. lessonae*.

Таким образом, по сравнению с головастиками, полученными в результате скрещиваний гибридов из популяционной системы L-E типа с одним из родительских видов, головастики, полученные в результате скрещивания гибридов из R-E системы с одним из родительских видов, образуют больше микроядер (относительные количества зародышевых клеток с микроядрами в гонадах гибридных головастиков из популяционной системы R-E типа больше, чем эти значения у головастиков из популяционной системы L-E типа). Это свидетельствует о более интенсивном протекании процессов элиминации в гонадах гибридных головастиков из систем R-E типа.

Анализ морфологии гонад взрослых животных из разных популяционных систем.

Были проанализированы конфокальные снимки 9 взрослых гибридных самцов из системы R-E типа и трех взрослых гибридных самцов из системы L-E типа. В ходе анализа были обнаружены зародышевые клетки, мейоциты на стадии профазы и метафазы мейоза, и сперматоциты. В цитоплазме зародышевых клеток мы не обнаружили микроядер. Мы можем заключить, что элиминация генетического материала одного из родительских видов происходит во время раннего развития гибридных головастиков и не происходит у взрослых гибридных животных.

Обсуждение результатов.

Идентификация хромосом обоих родительских видов с помощью видоспецифичных зондов.

В ходе работы было впервые проведено картирование нового зонда, полученного для хромосом *P. lessonae*. Мы показали, что применение нового зонда к характерной для двух пар хромосом (ядрышкообразующей 10-ой пары и акроцентрической 11-ой пары) *P. lessonae* последовательности, не встречающейся на хромосомах *P. ridibundus*, позволяет надежно идентифицировать хромосомы *P. lessonae* на метафазных пластинках во время митоза и мейоза, а также в ядрах клеток на стадии интерфазы. Зонд, гибридизующийся с этой последовательностью, был назван Ples289 и с его помощью можно напрямую идентифицировать две хромосомы, соответствующие хромосомам *P. lessonae*, в клетках *P. esculentus*. Применения зонда Ples289 в данном исследовании позволило впервые напрямую показать наличие хромосом *P. lessonae* в соматических клетках и клетках зародышевого пути взрослых гибридов и гибридных головастиков комплекса *P. esculentus*.

С момента открытия гибридной природы одного из самых распространенных видов лягушек центральной Европы – съедобной лягушки *P. esculentus* [Berger, 1967] исследователям были необходимы методы определения животных родительских и гибридных генотипов. Сначала лягушек разных генотипов различали по морфологическим признакам, с открытием электрофореза для подтверждения морфологического метода стали применять электрофоретический анализ подвижности маркерных белков [Bucci и др., 1990; Hg, S, 1981], в современных исследованиях активно применяется метод проточной ДНК – цитометрии [Dedukh и др., 2017; Pruvost, Hoffmann, Reyer, 2013]. Однако эти методы имеют ряд ограничений, так как не позволяют идентифицировать геномы отдельных клеток зародышевой линии, что необходимо для изучения процессов элиминации и эндорепликации. Ранее, идентификация хромосом *P. lessonae* была возможна только косвенными методами, посредством отсутствия яркого сигнала в центромерных районах при окрашивании DAPI [Bucci и др., 1990; Tunner, Herrich-Tunner, 1991]. Идентифицировать хромосомы *P. ridibundus* стало возможно благодаря выделению перицентромерной сателлитной последовательности, названной RrS1 [Ragghianti и др., 1995]. Использование ПЦР меченных зондов, полученных для мономера данной последовательности, а также олигонуклеотидных зондов позволило надежно идентифицировать все хромосомы *P. ridibundus* [Dedukh и др., 2019; Dedukh и др., 2020]. В ходе нашей работы мы адаптировали протокол для двухцветной FISH с зондами к RrS1 и новым зондом Ples289, позволяющим идентифицировать хромосомы обоих родительских видов в кариотипах диплоидных гибридов *P. esculentus*.

В ранних исследованиях хромосомы *P. lessonae* идентифицировались как хромосомы, не содержащие повтор *P. ridibundus* [Dedukh и др., 2019; Dedukh и др., 2020]. Также ранее было обнаружено различие в сайтах интерстициального повтора, позволяющего идентифицировать ядрышкообразующую хромосому *P. lessonae* [Dedukh и др., 2013; 2015]. Однако идентификация хромосом *P. lessonae* в ядрах интерфазных клеток и микроядрах ранее была невозможна. Мы также впервые провели картирование нового

зонда на мейотических хромосомах гибридов и на ядрах зародышевых клеток, что позволило надежно идентифицировать геном *P. lessonae* в зародышевых клетках.

Элиминация одного из родительских геномов у гибридных самцов из популяционных систем L-E и R-E типов происходит премейотически.

Согласно результатам настоящей работы, в гонадах головастиков из популяционной системы L-E типа происходит преимущественное удаление хромосом *P. lessonae*, в то время как у головастиков из системы R-E типа обнаруживаются микроядра с хромосомами обоих родительских видов. Также, согласно полученным нами данным, большая часть сперматоцитов взрослых гибридов из популяционных систем L-E типа включает в себя 13 бивалентов, содержащих геном *P. ridibundus*, что свидетельствует о премейотической элиминации хромосом *P. lessonae*. Таким образом, мы можем заключить, что удаление генома *P. lessonae*, а также эндорепликация генома *P. ridibundus* происходят премейотически.

В ранних работах было показано, что диплоидные гибридные самцы и самки из популяционных систем L-E типа, расположенных в центральной Европе, а также на востоке ареала в основном элиминируют генетический материал *P. lessonae* и производят гаметы, содержащие хромосомы *P. ridibundus* [Bogart, 1989; Bucci и др., 1990; Dedukh и др., 2019; Pruvost, Hoffmann, Reyer, 2013]. Кроме того, удаление генома *P. lessonae* диплоидными самцами было показано и в популяционных системах E типа [Christiansen, 2005; Christiansen, Reyer, 2009]. Таким образом, гибридные самцы в различных системах L-E типа производят в основном гаплоидные гаметы с геномом *P. ridibundus*.

Также мы обнаружили, что у гибридных самцов из популяционных систем L-E типа происходит формирование сперматоцитов с aberrantными наборами хромосом в виде 26 унивалентов хромосом обоих родительских видов и 26 бивалентов обоих родительских видов. Полученные нами данные также сходятся с данными литературы. В исследуемых популяционных системах с помощью проточной ДНК цитометрии были обнаружены нарушения гаметогенеза у диплоидных гибридных самцов [O Svinin и др., 2021]. Наличие сперматоцитов с 26 унивалентами, представленными хромосомами обоих родительских видов, свидетельствует о нарушении процессов элиминации и эндоредупликации. Такие сперматоциты, вероятнее всего, не смогут вступить в мейотические деления и не смогут сформировать нормальные гаметы. Наличие сперматоцитов с 26 бивалентами с хромосомами обоих родительских видов свидетельствует о нарушении процесса элиминации, но прохождении процесса эндоредупликации. Такие сперматоциты могут вступать в мейоз и формировать диплоидные гаметы. Формирование диплоидных сперматозоидов было показано для гибридов, однако они обычно не вносят существенного вклада в формирование жизнеспособного потомства, так как считается, что обладают меньшей подвижностью по сравнению с гаплоидными [Ploetner, 2005].

Мы показали, что гибридные самцы из популяционных систем R-E типа формируют сперматоциты как с 13 бивалентами с геномом *P. ridibundus*, так и с 13 бивалентами с геномом *P. lessonae*. Полученные результаты свидетельствуют о премейотической элиминации геномов разных родительских видов в разных соматических клетках. Таким образом, гибридные самцы производят одновременно 2 типа гамет: гаплоидные гаметы с геномом *P. ridibundus* и гаплоидные гаметы с геномом *P. lessonae*. Такой тип одновременного производства разных типов гамет получил название гибридная амфиспермия [Vinogradov и др., 1990]. Амфиспермичные гибридные самцы присутствуют во всех известных популяционных системах R-E типа и, вероятно, поддерживают воспроизводство гибридов в таких системах, так как производят гаметы с геномом *P. lessonae* [Biriuk и др., 2016; Dedukh и др., 2017; Doležálková и др., 2016; Doležálková-Kašánková и др., 2018; Vinogradov и др., 1990]

Мы обнаружили, что помимо гамет, содержащих 13 бивалентов одного из родительских видов, диплоидные самцы из популяционных систем R-E типов также производят гаметы с aberrantными наборами хромосом, представленными 26 унивалентами обоих родительских видов. В более ранних работах также было показано наличие подобных aberrantных сперматоцитов и ооцитов у гибридов из популяционных систем R-E типов [Biriuk и др., 2016; Doležálková и др., 2016]. Помимо этого, нами были обнаружены сперматоциты с 26 бивалентами с хромосомами обоих родительских видов, что ранее также было показано для гибридов из популяционных систем R-E типа [Dedukh и др., 2015; Dedukh и др., 2017].

Таким образом, основываясь на наших данных и данных литературы, можно заключить, что механизм воспроизводства гибридов в системах R-E типа не симметричен механизму в системах L-E типа. Гибриды обоих полов в популяционных системах L-E типа в основном элиминируют генетический материал *P. lessonae* и формируют гаметы с геномом *P. ridibundus*, в то время как гибриды из популяционных систем R-E типа элиминируют генетический материал разных родительских видов и производят гаметы с геномами разных родительских видов. Также у гибридов из систем R-E типа встречается большее количество гамет с aberrantными наборами хромосом (26 унивалентов и бивалентов хромосом обоих родительских видов).

Элиминация одного из родительских геномов происходит в ходе раннего гаметогенеза головастиков, полученных от скрещивания гибридов из популяционных систем L-E и R-E типов.

В данном исследовании мы провели двуцветную 3D FISH с использованием зонда RrS1 и нового зонда, что позволило идентифицировать хромосомы *P. lessonae* в микроядрах гонад головастиков из популяционных систем R-E типа. Нам удалось показать, что у гибридных головастиков мужского пола из популяционных систем L-E типа происходит преимущественное формирование микроядер, содержащих генетический материал *P. lessonae*, что соответствует результатам анализа мейотических метафаз взрослых

гибридных самцов из популяционной системы этого типа. Также мы обнаружили наличие хромосом, не прикрепившихся к нитям веретена деления и отстающих в анафазе хромосом, которые затем формируют микроядра. Лишь небольшой процент таких хромосом имели сигнал от повтора RrS1, что говорит об их вероятной принадлежности к генотипу *P. lessonae*. Также мы обнаружили, что в гонадах головастиков из популяционных систем R-E типа происходит формирование микроядер двух типов, с хромосомами *P. lessonae* и с хромосомами *P. ridibundus*. Нам удалось впервые напрямую показать наличие хромосом *P. lessonae* в составе содержимого микроядер. Наличие микроядер в гонадах *P. esculentus* было показано еще в 1994 году [Ogielska, 1994], тогда же и было выдвинуто предположение о том, что посредством формирования микроядер (ранее ядерно-подобных телец) происходит элиминация генома одного из родительских видов. В дальнейших исследованиях с помощью FISH с зондом RrS1 было подтверждено присутствие хромосом *P. ridibundus* в содержимом микроядер [Dedukh и др., 2019; Dedukh и др., 2020]. О присутствии хромосом *P. lessonae* в содержимом микроядер судили по отсутствию яркого сигнала от повтора RrS1 [Dedukh и др., 2019; Dedukh и др., 2020].

На данный момент известно два возможных механизма формирования микроядер. Они могут формироваться во время аберрантных митозов из хромосом, не прикрепившихся к нитям веретена деления и затем отстающих при расхождении в анафазе [Dedukh и др., 2020; Gernand и др., 2005; Gernand и др., 2006], что также было показано в нашем исследовании. Также микроядра могут формироваться путем отпочковывания от интерфазных ядер [Chmielewska и др., 2018; Gernand и др., 2005]. Исследование на наличие данного процесса в гонадах гибридных головастиков в данной работе не проводилось. Таким образом, образование микроядер происходит в гонадах гибридов до начала мейотических делений и формирования гамет [Chmielewska и др., 2018; Dedukh и др., 2017]. То, что элиминация хромосом одного из родительских видов происходит до начала мейоза, подтверждают и наши данные по анализу сперматоцитов взрослых животных. Преобладающее количество сперматоцитов с 13 бивалентами, состоящими из хромосом одного из родительских видов, говорит о том, что процессы элиминации и эндорепликации произошли до мейоза.

Элиминация генетического материала одного из родительских видов происходит на ранних стадиях онтогенеза гибридных головастиков и не происходит у взрослых гибридов.

В гонадах проанализированных взрослых гибридных самцов из популяций L-E и R-E типов микроядра обнаружены не были. Анализы морфологии гонад, а также идентификация геномов сперматоцитов взрослых гибридных самцов, проведенные в данном исследовании, свидетельствуют о премейотической элиминации генетического материала одного из родительских видов, происходящей на ранних стадиях онтогенеза. Премейотическая элиминация одного из родительских геномов была также показана ранее

для животных из других популяционных систем [Bucci и др., 1990; Hg, S, 1981; Tunner, Neppich-Tunner, 1991].

Предшествующие исследования процессов элиминации и эндорепликации одного из родительских геномов в гонадах гибридных лягушек комплекса *P. esculentus* были сосредоточены на головастиках, так как предполагалось, что в гонадах взрослых гибридных животных данные процессы уже не происходят [Chmielewska и др., 2018; Dedukh и др., 2017, Ogielska, 1994]. Данное предположение было подтверждено в нашем исследовании на основе результатов по анализу геномных композиций сперматоцитов взрослых гибридных самцов и анализу морфологии гонад взрослых гибридных самцов.

Выводы.

1. Повторяющаяся последовательность, уникальная для генома *P. lessonae*, локализуется на двух парах хромосом *P. lessonae* и на двух парах хромосом *P. esculentus*, соответствующих хромосомам *P. lessonae*, и не локализуется на хромосомах *P. ridibundus*.
2. У большинства гибридных самцов из системы L-E типа происходит премейотическая элиминация генома *P. lessonae* и последующая эндоредупликация генома *P. ridibundus*. У гибридных самцов из системы R-E типа происходит премейотическая элиминация геномов разных родительских видов и эндоредупликация сохранившихся геномов в разных популяциях зародышевых клеток.
3. У большинства гибридных самцов из системы R-E типа и некоторых гибридных самцов из системы L-E типа могут формироваться сперматоциты с aberrantными наборами хромосом.
4. В гонадах гибридных головастиков из популяционной системы L-E типа формируются микроядра с хромосомами *P. lessonae*. В гонадах гибридных головастиков из системы R-E типа формируются микроядра, включающие хромосомы *P. ridibundus*, и микроядра, включающие хромосомы *P. lessonae*, что впервые было показано напрямую. В гонадах взрослых гибридных самцов из обеих популяционных систем микроядра не обнаруживаются.
5. Избирательная элиминация одного из родительских геномов в клетках зародышевой линии происходит во время раннего развития у головастиков и не происходит у взрослых гибридов.

Приложения.

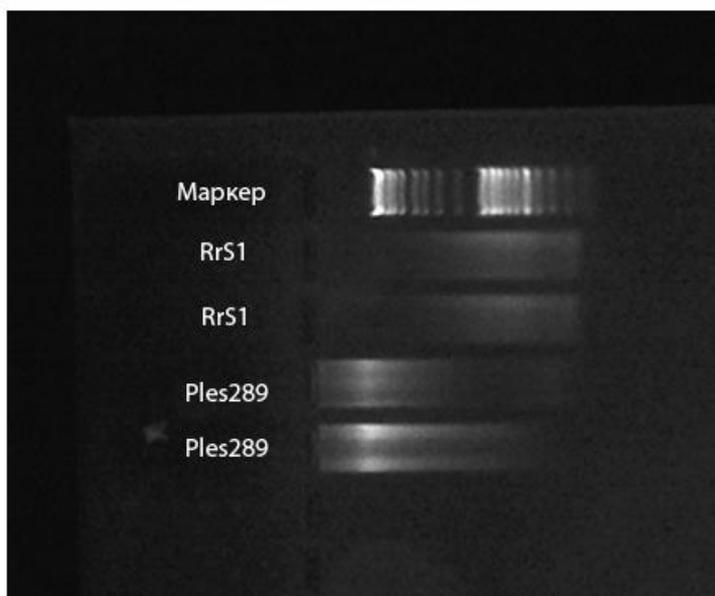


Рис.1. Результаты электрофореза с зондом RrS1 и Ples289.

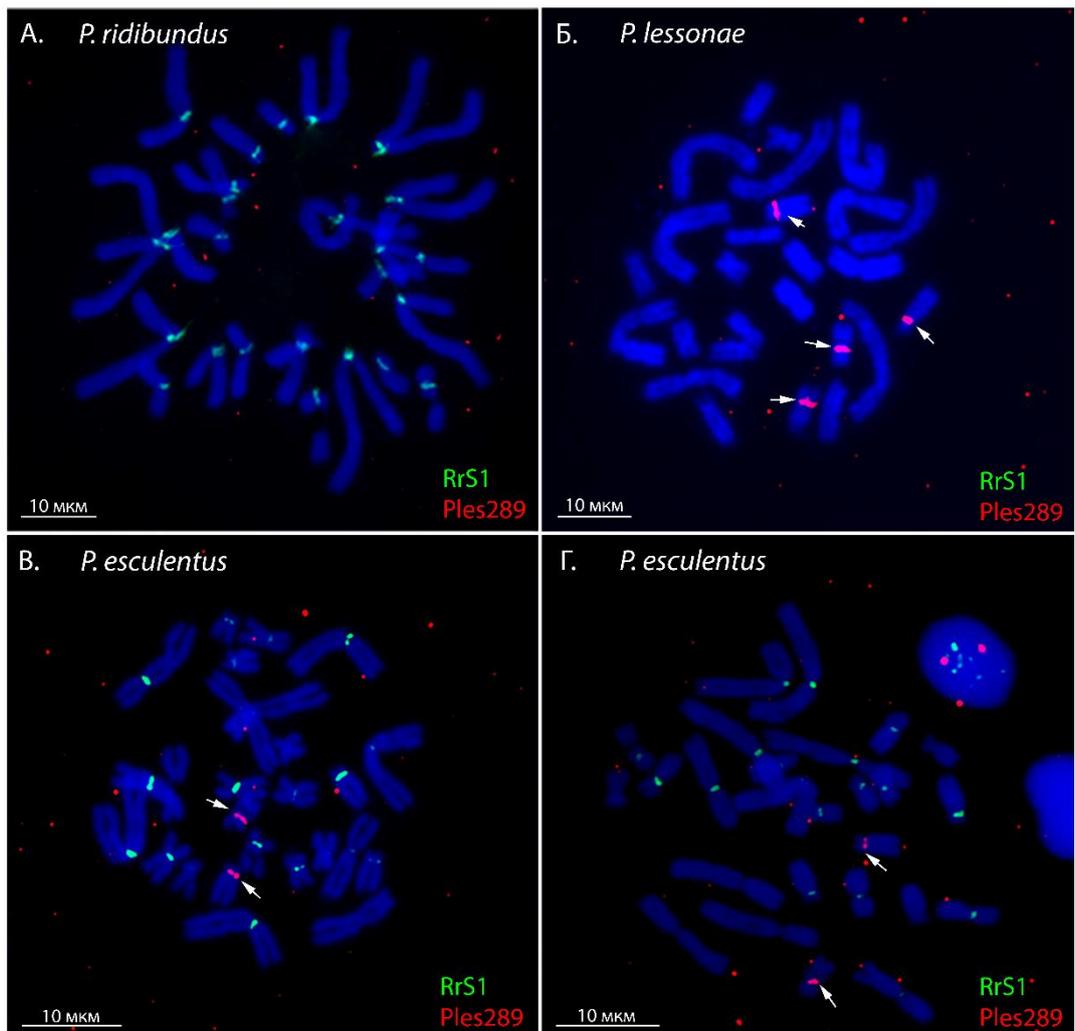


Рис.2. Картирование видоспецифичных повторов RrS1 и Ples289 на хромосомах родительских видов и гибридов из комплекса *P. esculentus*. Стрелки указывают на сигналы от повтора Ples289 на двух хромосомах *P. esculentus*, соответствующих хромосомам *P. lessonae*. Масштабная линейка = 10 мкм.

А. Двухцветная флуоресцентная *in situ* гибридизация с зондами RrS1 (зеленый) и Ples289 (красный) метафазных митотических хромосомах *P. ridibundus*. Сигналов от повтора Ples289 не наблюдается.

Б. Двухцветная флуоресцентная *in situ* гибридизация с зондами RrS1 (зеленый) и Ples289 (красный) на метафазных митотических хромосомах *P. lessonae*.

В. Г. Двухцветная флуоресцентная *in situ* гибридизация с зондами RrS1 (зеленый) и Ples289 (красный) на метафазных митотических хромосомах *P. esculentus*.

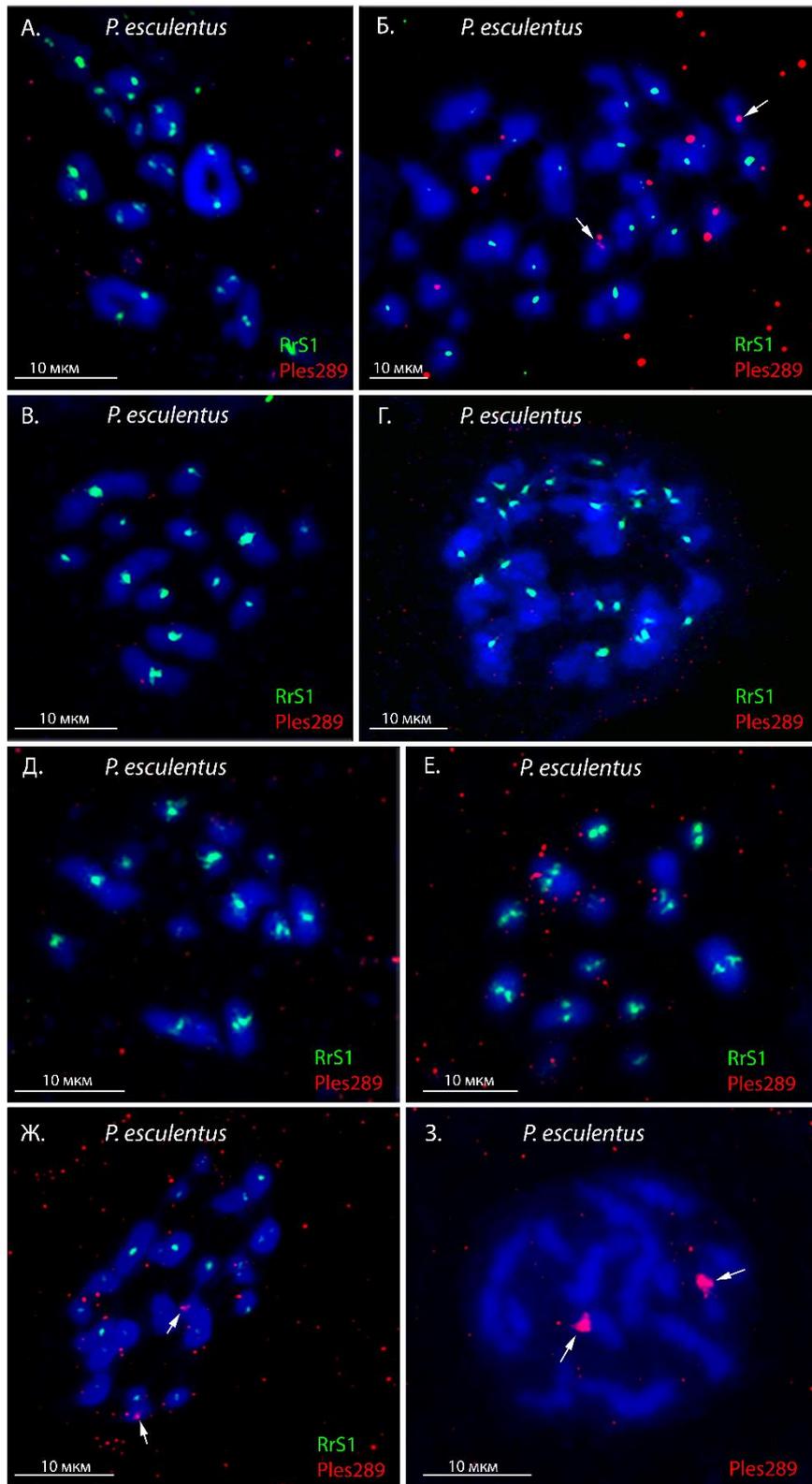


Рис.3. Анализ геномных композиций сперматоцитов взрослых гибридных самцов из популяционных систем L-E (А.-Г.) и R-E (Д-З.) типов.

А. 13 биваленов *P. ridibundus*. Б. 26 унивалентов *P. ridibundus* и *P. lessonae*. В. 13 унивалентов *P. ridibundus*. Г. 26 бивалентов *P. ridibundus*. Д. 13 унивалентов *P. ridibundus*. Е. 13 биваленов *P. ridibundus*. Ж. 26 унивалентов *P. lessonae* и *P. ridibundus*. З. 13 унивалентов *P. lessonae*. Стрелки указывают на сигнал от повтора Ples289.

Популяционная система	IDs	Количество сперматозоидов с 13 унивалентами	Хромосомный набор	Количество сперматозоидов с 26 унивалентами	Хромосомный набор	Количество сперматозоидов с 13 бивалентами	Хромосомный набор	Количество сперматозоидов с 26 бивалентами	Хромосомный набор
R-E	5cz_male_190220_p9	2	R	0	0	5	R	3	R+L
	1cz_male_190220_p7	0		4	R+L	3	R	0	0
	3cz_male_190220_p3	3	R	4	0	3	R	1	R+L
	cz6_male_190220_p12	11	R	8	R+L	16	R, L, R+L	5	R+L
	3cz_male_190220_p3	3	R+L	3	R+L	3	R	1	R+L
	12-2016_AD3_RL_p2_289	6	L	7	R+L, L	3	L	0	
	12_2016_ad3	1	L	0		0		0	
	12_2016_ad2m_289+RrS1	2	L	9	R, L, R+L	22	R, L, R+L	0	
	14_2016_ad1m_	0		0		4	L	0	
	14_2016_AD1M_4	4	R,L	2	R+L	8	R,L	1	L
	16cz413m	0		8	R	3	R	0	
L-E	mari el_1	8	R	3	R, R+L	15	R	0	
	mari el_3	8	R	0		4	R	0	
	mari el_14	5	R	0		30	R	1	R+L
	ML____.11.19_2	3	R	2	R, R+L	8	R,L	0	
	ML____.11.19_5	0		1	R	1	R	0	
	ML____.11.19_6	2	R	2	R, R+L	4	R	0	
	ML____.11.19_9_1_F	3	R	0		7	R	0	
	ML____.11.19_10	7	R	0		9	R	0	
	ML____.11.19_11	19	R	3	R, R+L	17	R	0	
	ML____.11.19_13	0		1	R+L	10	R	0	
	ML____.11.19_14	3	R	3	R, R+L	18	R	0	
	ML____.11.19_15	1	R	4	R, R+L	34	R	6	R
	ML____.11.19_17	1	R+L	0		1	L	0	
	ML_21.0619_4	0		2	R+L	1	R	0	
	ML_21.0619_12	0		0		2	R	0	
ML_21.0619_16	1	R	1	R+L	15	R	0		

Таб.1. Обобщение результатов по анализу геномных композиций сперматозоидов у диплоидных гибридных самцов из популяционных систем R-E и L-E типов.

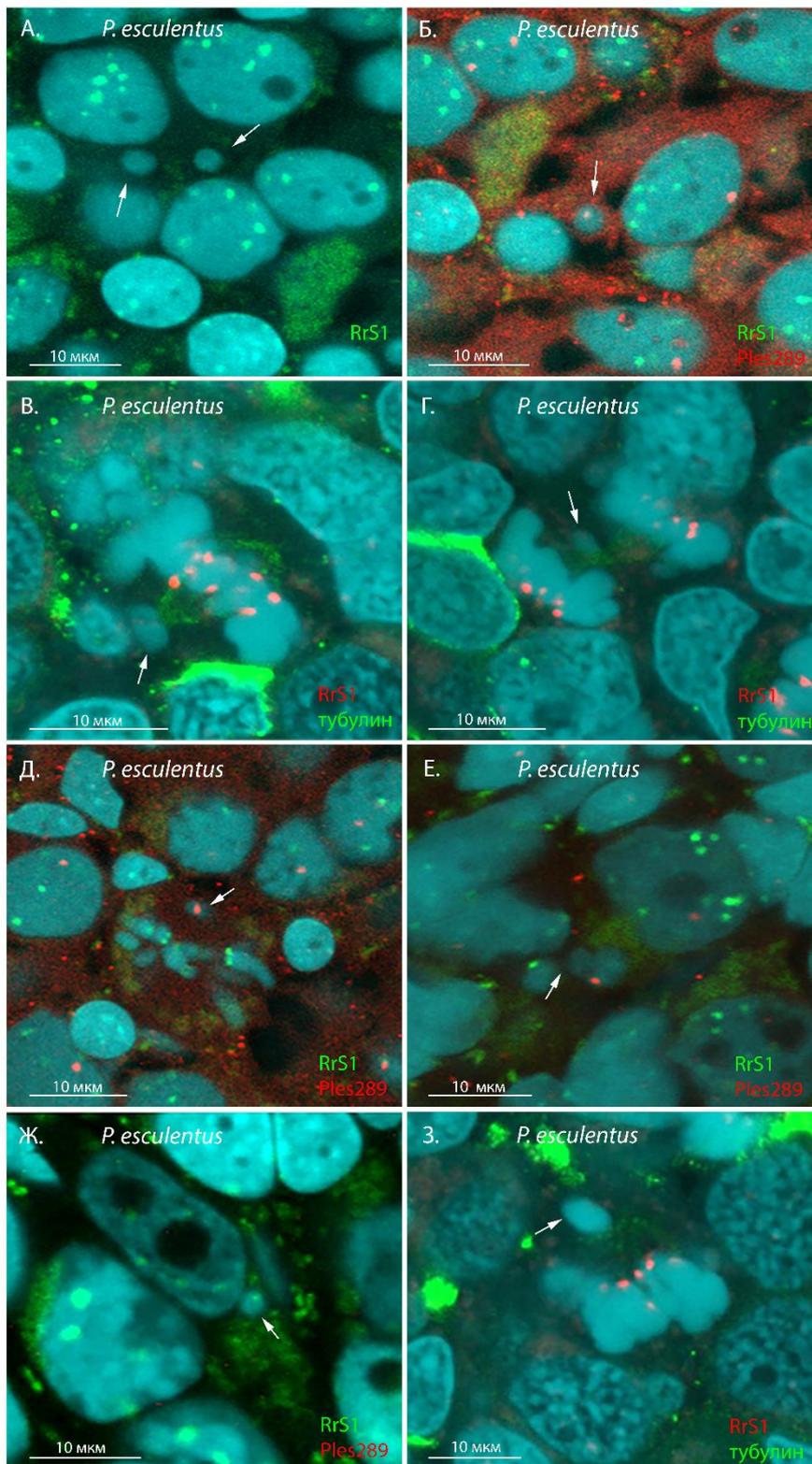


Рис.4. Идентификация хромосом родительских видов в клетках зародышевой линии во время раннего гаметогенеза у головастиков, полученных от скрещивания гибридных самцов из популяций L-E (А.-Г.) и R-E (Д.-З.) типов с одним из родительских видов.

А. Микроядро без повтора RrS1. Б. Микроядро с повтором Ples289. В. Хромосома, не прикрепившаяся к нитям веретена деления. Г. Отстающая в анафазе хромосома Д. Хромосома, не прикрепившаяся к нитям веретена деления, с повтором Ples289. Е. Микроядро с повтором Ples289 Ж. Микроядро с повтором RrS1. З. Хромосома, не прикрепившаяся к нитям веретена деления. А.,Б.,Е., З. Стрелки указывают на микроядра; В., Г., Д., З., Стрелки указывают на хромосомы, не прикрепавшиеся к нитям веретена деления. Масштабная линейка = 10 мкм.

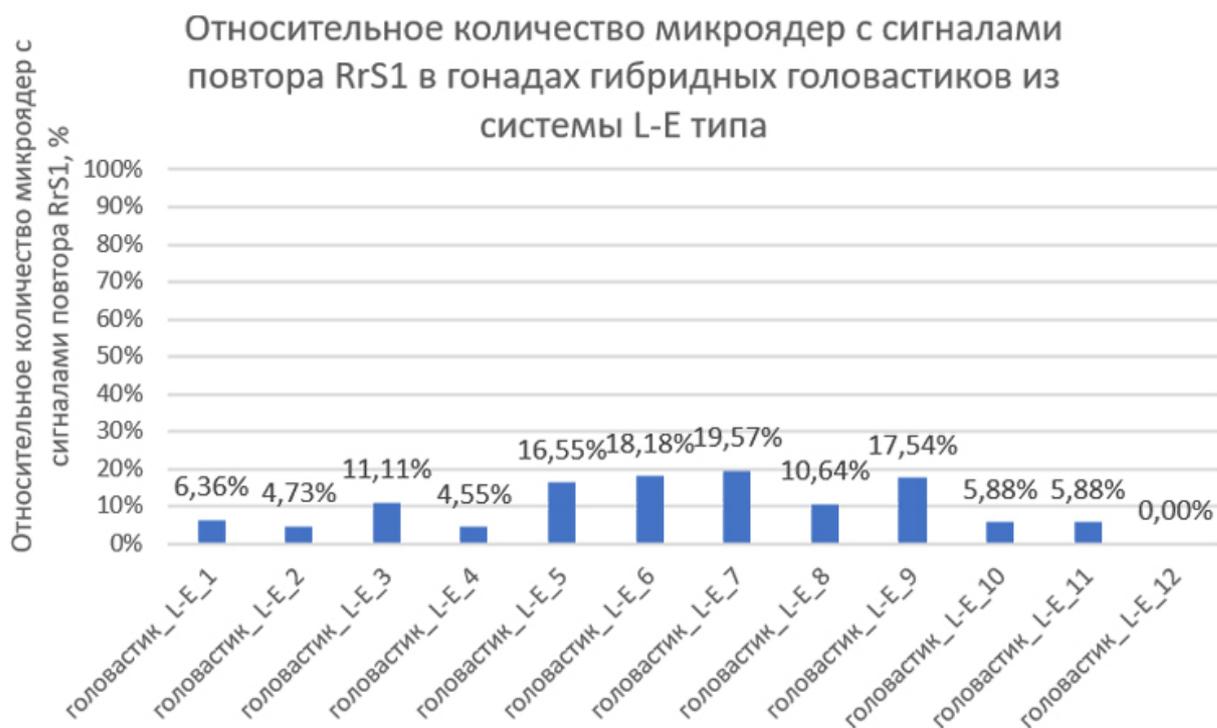


Рис.5. Относительное количество микроядер с сигналами повтора RrS1 в гонадах гибридных головастика из системы L-E (А) и R-E (Б) типов. Относительное количество

микроядер с сигналами повтора RrS1 рассчитано как процентное отношение микроядер с сигналами повтора RrS1 к общему количеству микроядер для каждого головастика.

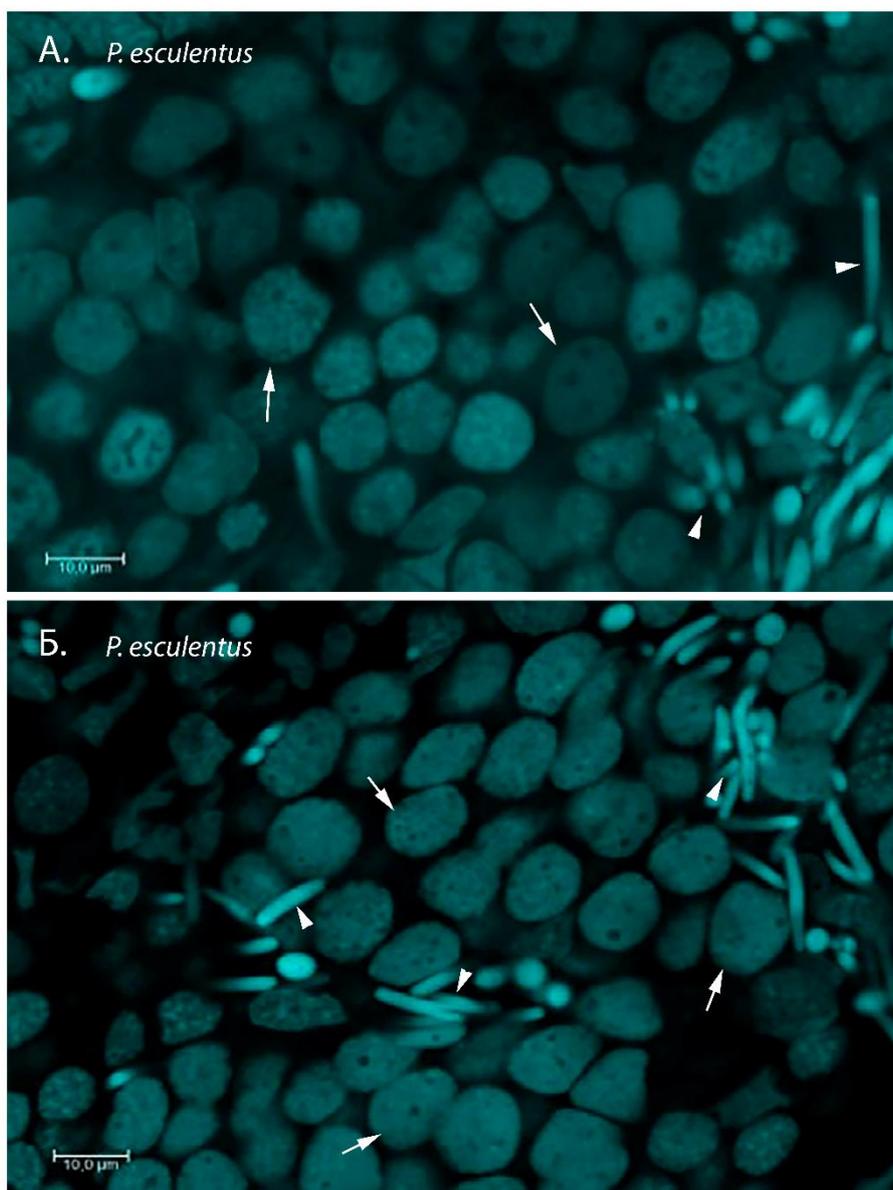


Рис.6. Анализ морфологии гонад взрослых гибридных самцов из популяций L-E (А) и R-E (Б) типов

А. Гонада взрослого гибридного самца из популяции L-E типа. Стрелки указывают на зародышевые клетки, наконечники стрелок на сперматиды. Масштабная линейка = 10 мкм.

Список цитируемой литературы.

1. Schoenmakers S. и др. Meiotic silencing and fragmentation of the male germline restricted chromosome in zebra finch // *Chromosoma*. 2010. Т. 119. № 3. С. 311–324.
2. Austin B., Trivers R. *Genes in Conflict* // *Genes in Conflict*. : Harvard University Press, 2009.
3. Bartmańska J., Ogielska M. Development of testes and differentiation of germ cells in water frogs of the *Rana esculenta* - complex (Amphibia, Anura) // *Amphibia-Reptilia*. 1999. Т. 20. № 3. С. 251–263.
4. Beermann S. The diminution of heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda) // *Chromosoma*. 1977. Т. 60. № 4. С. 297–344.
5. Biriuk O. V. и др. Gamete production patterns and mating systems in water frogs of the hybridogenetic *Pelophylax esculentus* complex in north-eastern Ukraine // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2016. Т. 54. № 3. С. 215–225.
6. Bogart J. P. и др. Sex in unisexual salamanders: discovery of a new sperm donor with ancient affinities // *Heredity*. 2009. Т. 103. № 6. С. 483–493.
7. Bogart P. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* // New York State. 1989.
8. Borodin P. M. и др. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae) // *Genome*. 2011.
9. Bucci S. и др. Lampbrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing hybrid *Rana esculenta* and its parental species // *Journal of Experimental Zoology*. 1990. Т. 255. № 1. С. 37–56.
10. Bürki E. The expression of creatine kinase isozymes in *Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis laevis*, and their viable hybrid // *Biochemical genetics*. 1985. Т. 23. № 1–2. С. 73–88.
11. Chalker D. L., Yao M.-C. Nongenic, bidirectional transcription precedes and may promote developmental DNA deletion in *Tetrahymena thermophila* // *Genes & development*. 2001. Т. 15. № 10. С. 1287–1298.
12. Chmielewska M. и др. The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* // *Scientific Reports*. 2018. Т. 8. № 1. С. 7870.

13. Christiansen D. G. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex // *Molecular Ecology Notes*. 2005. Т. 5. № 1. С. 190–193.
14. Christiansen D. G. Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*) // *BMC Evol Biol*. 2009. Т. 9. № 1. С. 135.
15. Christiansen D. G., Reyer H.-U. From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs // *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 2009. Т. 63. № 7. С. 1754–1768.
16. Dedukh D. и др. Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine // *BMC Genet*. 2013. Т. 14. № 1. С. 26.
17. Dedukh D. и др. Optional Endoreplication and Selective Elimination of Parental Genomes during Oogenesis in Diploid and Triploid Hybrid European Water Frogs // *PLOS ONE*. 2015. Т. 10. № 4. С. e0123304.
18. Dedukh D. и др. Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in R-E systems: results from artificial crossings experiments // *BMC Evolutionary Biology*. 2017. Т. 17. № 1. С. 220.
19. Dedukh D. и др. Variation in hybridogenetic hybrid emergence between populations of water frogs from the *Pelophylax esculentus* complex // *PLOS ONE*. 2019. Т. 14. № 11. С. e0224759.
20. Dedukh D. и др. Micronuclei in germ cells of hybrid frogs from *Pelophylax esculentus* complex contain gradually eliminated chromosomes // *Scientific Reports*. 2020. Т. 10. № 1. С. 8720.
21. Del Priore L., Pigozzi M. I. Histone modifications related to chromosome silencing and elimination during male meiosis in Bengalese finch // *Chromosoma*. 2014. Т. 123. № 3. С. 293–302.
22. Doležálková M. и др. Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? // *BMC Genetics*. 2016. Т. 17. № 1. С. 100.
23. Doležálková-Kašánková M. и др. All-male hybrids of a tetrapod *Pelophylax esculentus* share its origin and genetics of maintenance // *Biology of Sex Differences*. 2018. Т. 9. № 1. С. 13.
24. Fang W. и др. Piwi-Interacting RNAs Protect DNA against Loss during *Oxytricha* Genome Rearrangement // *Cell*. 2012. Т. 151. № 6. С. 1243–1255.
25. Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry // *Health physics*. 2010. Т. 98. № 2. С. 234–243.
26. Fenech M., Crott J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the

- cytokinesis-block micronucleus assay // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2002. T. 504. № 1–2. С. 131–136.
27. Frost D. R. и др. THE AMPHIBIAN TREE OF LIFE // *amnb*. 2006. Т. 2006. № 297. С. 1–291.
28. Gernand D. и др. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation // *The Plant Cell*. 2005. Т. 17. № 9. С. 2431–2438.
29. Gernand D. и др. Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization // *CGR*. 2006. Т. 114. № 2. С. 169–174.
30. Gibeaux R. и др. Paternal chromosome loss and metabolic crisis contribute to hybrid inviability in *Xenopus* // *Nature*. 2018. Т. 553. № 7688. С. 337–341.
31. Goday C., Pigozzi M. I. Heterochromatin and histone modifications in the germline-restricted chromosome of the zebra finch undergoing elimination during spermatogenesis // *Chromosoma*. 2010. Т. 119. № 3. С. 325–336.
32. Gosner K. L. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification // *Herpetologica*. 1960. Т. 16. № 3. С. 183–190.
33. Goto Y., Kubota S., Kohno S. Highly repetitive DNA sequences that are restricted to the germ line in the hagfish *Eptatretus cirrhatus*: a mosaic of eliminated elements // *Chromosoma*. 1998. Т. 107. № 1. С. 17–32.
34. Grishanin A. K., Shekhovtsov A. K., Бо\и. Chromatin diminution at the border of the XX and XXI centuries.
35. Grishanin A. K., Zagoskin M. V. Chromatin diminution in *Cyclops kolensis* Lill. (Copepoda, Crustacea) as a radical way to inactivate redundant genome in somatic cells // *Cytogenetic and genome research*. 2018. Т. 156. № 3. С. 165–172.
36. Haczkiwicz K., Ogielska M. Gonadal Sex Differentiation in Frogs: How Testes Become Shorter than Ovaries // *jzoo*. 2013. Т. 30. № 2. С. 125–134.
37. Hg T., S H. Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. // *Naturwissenschaften*. 1981. Т. 68. № 4. С. 207–208.
38. Ishii T., Karimi-Ashtiyani R., Houben A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms // *Annual review of plant biology*. 2016. Т. 67. С. 421–438.
39. Islam F. B. и др. Male hybrid sterility in the mule duck is associated with meiotic arrest in primary spermatocytes // *The Journal of Poultry Science*. 2013. С. 0130011.
40. Kang Y. и др. Differential Chromosomal Localization of Centromeric Histone CENP-A Contributes to Nematode Programmed DNA Elimination // *Cell Reports*. 2016. Т. 16. № 9. С. 2308–2316.

41. Kinsella C. M. и др. Programmed DNA elimination of germline development genes in songbirds // *Nature Communications*. 2019. Т. 10. № 1. С. 5468.
42. Kloc M., Zagrodzinska B. Chromatin elimination—an oddity or a common mechanism in differentiation and development? // *Differentiation*. 2001. Т. 68. № 2–3. С. 84–91.
43. Kojima N. F. и др. Whole chromosome elimination and chromosome terminus elimination both contribute to somatic differentiation in Taiwanese hagfish *Paramyxine sheni* // *Chromosome research*. 2010. Т. 18. № 3. С. 383–400.
44. Kubota S. и др. Germ line-restricted, highly repeated DNA sequences and their chromosomal localization in a Japanese hagfish (*Eptatretus okinoseanus*) // *Chromosoma*. 1993. Т. 102. № 3. С. 163–173.
45. Kubota S. и др. Chromosome elimination in northeast Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii* (Cyclostomata, Agnatha) // *Journal of Heredity*. 1994. Т. 85. № 5. С. 413–415.
46. Laurie D. A., Bryan G. J., Snape J. W. Genomic relationships, conserved synteny and wide-hybrids // *BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE SERIES*. 1997. С. 77–102.
47. Lymberakis P. и др. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region // *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007. Т. 44. № 1. С. 115–125.
48. Malone C. D. и др. Germ line transcripts are processed by a Dicer-like protein that is essential for developmentally programmed genome rearrangements of *Tetrahymena thermophila* // *Molecular and cellular biology*. 2005. Т. 25. № 20. С. 9151–9164.
49. Mochizuki K. и др. Analysis of a piwi-Related Gene Implicates Small RNAs in Genome Rearrangement in *Tetrahymena* // *Cell*. 2002. Т. 110. № 6. С. 689–699.
50. Mochizuki K. DNA rearrangements directed by non-coding RNAs in ciliates // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2010. Т. 1. № 3. С. 376–387.
51. Mochizuki K., Gorovsky M. A. A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase // *Genes & development*. 2005. Т. 19. № 1. С. 77–89.
52. Müller F., Tobler H. Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens* // *International journal for parasitology*. 2000a. Т. 30. № 4. С. 391–399.
53. Müller F., Tobler H. Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens* // *International journal for parasitology*. 2000b. Т. 30. № 4. С. 391–399.
54. Narbonne P., Simpson D. E., Gurdon J. B. Deficient Induction Response in a *Xenopus* Nucleocytoplasmic Hybrid // *PLOS Biology*. 2011. Т. 9. № 11. С. e1001197.
55. Nemetschke L. и др. Genetics, Chromatin Diminution, and Sex Chromosome Evolution in the Parasitic Nematode Genus *Strongyloides* // *Current Biology*. 2010. Т. 20. № 19. С. 1687–1696.

56. O Svinin A. и др. Genetic structure, morphological variation, and gametogenic peculiarities in water frogs (*Pelophylax*) from northeastern European Russia // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2021. Т. 59. № 3. С. 646–662.
57. Ogielska M. и др. A stockpile of ova in the grass frog *Rana temporaria* is established once for the life span. Do ovaries in amphibians and in mammals follow the same evolutionary strategy? // *The Anatomical Record*. 2013. Т. 296. № 4. С. 638–653.
58. Ogielska M., Kotusz A. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians // *Journal of Morphology*. 2004. Т. 259. № 1. С. 41–54.
59. Pigozzi M. I., Solari A. J. Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata* // *Chromosome Research*. 1998. Т. 6. № 2. С. 105–113.
60. Pigozzi M. I., Solari A. J. The germ-line-restricted chromosome in the zebra finch: recombination in females and elimination in males // *Chromosoma*. 2005. Т. 114. № 6. С. 403–409.
61. Prescott D. M. The DNA of ciliated protozoa. // *Microbiological reviews*. 1994. Т. 58. № 2. С. 233–267.
62. Pruvost N. B. M., Hoffmann A., Reyer H.-U. Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (*Pelophylax esculentus*) // *Ecology and Evolution*. 2013. Т. 3. № 9. С. 2933–2946.
63. Raghianti M. и др. Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species // *Chromosome Research*. 1995. Т. 3. № 8. С. 497–506.
64. Ravi M., Chan S. W. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination // *Nature*. 2010. Т. 464. № 7288. С. 615–618.
65. Sanei M. и др. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Т. 108. № 33. С. E498–E505.
66. Schön I., Martens K., Dijk P. van. Lost sex // *The evolutionary biology of parthenogenesis*. 2009. С. 1–615.
67. Schwander T., Oldroyd B. P. Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. Т. 371. № 1706. С. 20150534.
68. Smith J. J. и др. Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Т. 106. № 27. С. 11212–11217.
69. Smith J. J., Timoshevskiy V. A., Saraceno C. Programmed DNA Elimination in Vertebrates // *Annual Review of Animal Biosciences*. 2020. Т. 9.
70. Smithies O. Antibody Variability: Somatic recombination between the elements of «antibody gene pairs» may explain antibody variability // *Science*. 1967. Т. 157. № 3786. С. 267–273.

71. Spangenberg V. и др. Cytogenetic mechanisms of unisexuality in rock lizards // *Scientific Reports*. 2020. Т. 10. № 1. С. 8697.
72. Streit A. и др. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes // *Current opinion in microbiology*. 2016. Т. 32. С. 120–127.
73. Timoshevskiy V. A. и др. Cellular and Molecular Features of Developmentally Programmed Genome Rearrangement in a Vertebrate (Sea Lamprey: *Petromyzon marinus*) // *PLOS Genetics*. 2016. Т. 12. № 6. С. e1006103.
74. Tobler H. The differentiation of germ and somatic cell lines in nematodes // *Germ Line—Soma Differentiation*. 1986. С. 1–69.
75. Torgasheva A. A. и др. Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. Т. 116. № 24. С. 11845–11850.
76. Torgasheva A. A., Borodin P. M. Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis* // *Scientific Reports*. 2016. Т. 6. № 1. С. 36564.
77. Tunner H. G., Heppich-Tunner S. Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog // *Naturwissenschaften*. 1991. Т. 78. № 1. С. 32–34.
78. Uzzell T., Hotz H., Berger L. Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes // *Journal of Experimental Zoology*. 1980. Т. 214. № 3. С. 251–259.
79. Vinogradov A. E. и др. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry // *Genome*. 1990. Т. 33. № 5. С. 619–627.
80. Wang J. и др. Silencing of Germline-Expressed Genes by DNA Elimination in Somatic Cells // *Developmental Cell*. 2012. Т. 23. № 5. С. 1072–1080.
81. Wang J. и др. Comprehensive chromosome end remodeling during programmed DNA elimination // *Current Biology*. 2020. Т. 30. № 17. С. 3397–3413.
82. Wang J., Davis R. E. Programmed DNA elimination in multicellular organisms // *Current opinion in genetics & development*. 2014. Т. 27. С. 26–34.
83. Zhang J. и др. Meiosis completion and various sperm responses lead to unisexual and sexual reproduction modes in one clone of polyploid *Carassius gibelio* // *Scientific Reports*. 2015. Т. 5. № 1. С. 10898.
84. Zhao Z.-K. и др. The role of HIRA and maternal histones in sperm nucleus decondensation in the gibel carp and color crucian carp // *Molecular reproduction and development*. 2011. Т. 78. № 2. С. 139–147.
85. – Heppich. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta* // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 1978- Wiley Online Library

86. Berger, L., Embryonal and larval development of F₁ generation of green frogs different combinations // *Acta zool. cracov.*12 (1967) 123–160.
87. Plötner, J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche: von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation; mit 9 Tabellen. // Laurenti-Verlag, 2005).
88. M. Ogielska. Nucleus-like bodies in gonial cells of *Rana esculenta* [Amphibia, Anura] tadpoles-a putative way of chromosome elimination // *Zoologica Poloniae*, 1994.
89. Heinz G. Tunner. Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 12, 309–314 (1974).