

АНОТАЦІЯ

Пустовалова Е. С. Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023.

Дисертаційна робота присвячена встановленню особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. У ході роботи визначалися особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *Pelophylax esculentus* із досліджених геміклональних популяційних систем (ГПС) Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб: Нижнього Добрицького ставу, Корякова ставу, Іськова ставу (околиці с. Гайдари), заплави р. Мож (с. Тимченки). На підставі отриманих даних встановлювались шляхи гаметогенезу у досліджених гібридних самців та був оцінений їх внесок у підтримання складу геміклональних популяційних систем.

Матеріал за участю автора роботи збирали протягом 2016-2022 років. Збір вибірок зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex відбувався з природних місцеперебувань. Всього було проаналізовано 762 зелених жаби роду *Pelophylax*. Визначення таксономічної приналежності зелених жаб проводилося за комплексом морфологічних ознак (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2005; Шабанов, 2015). Попереднє визначення плоїдності проводилося за допомогою цитометрії еритроцитів (Бондарева и др., 2012), а згодом підтверджено Ag-, DAPI-зabarвленням хромосом на каріологічних препаратах (Howell, Black 1980; Birstain, 1984; Ragghianti et al., 1995; Ogielska et al., 2004; Вегерина и др., 2013;

Бірюк, 2016). Додатково, проводили цитометрію сперматозоїдів на зразках, отриманих з уринальної сперми самців (Степаненко і др., 2017). Встановлення каріотипів соматичних тканин і сім'яників проводили за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) (Ragghianti et al., 1995; Pustovalova et al., 2022, 2023; Choleva et al., 2023), і для деяких особин підтверджували за допомогою порівняльної геномної гібридизації (CGH) (Zalesna et al., 2011; Doležálková et al., 2016).

За результатами досліджень, кожен із чотирьох локалітетів населяють особини *P. ridibundus* та *P. esculentus* (ди- та триплоїдні), а отже, такі ГПС належать до R–E–Er–ГПС типу. Для того, щоб зрозуміти, як саме відбувається успішне відтворення гібридів у ГПС, необхідно з'ясувати механізми, що забезпечують розмноження гібридних самців, проаналізувавши склад їх статевих продуктів. Тому, для оцінки вкладу гібридних самців у відтворення цих систем, рандомним чином обрали 52 дорослих самців *P. esculentus* (30 гібридних самців з Нижнього Добрицького ставу, 7 самців з Корякова ставу, 8 самців з річки Мож, 7 самців з Іськова ставу) і дослідили їх гаметогенез шляхом встановлення складу геному в їх сперматоцитах та сперматидях. З використанням FISH із видоспецифічними до перицентромерних ділянок хромосом *P. lessonae* та *P. ridibundus* зондами Ples289 та RrS1 відповідно, показано, що з 52 досліджених диплоїдних гібридних самців п'ять особин мали у сім'яниках сперматоцити та сперматиди виключно із геномом *P. lessonae*, а 13 особин — виключно з геномом *P. ridibundus*. 29 особин в одних сперматоцитах та сперматидях мали геном *P. lessonae*, а в інших — геном *P. ridibundus*; за запропонованою нами термінологією, ці особини є амфігаметними. Ще у 8 самців з 52, що були досліджені, у сім'яниках зареєстровано диплоїдні сперматоцити та поодинокі диплоїдні сперматиди.

Попри переважну передачу гібридами в досліджуваних ГПС геномів R, в цих ГПС щороку спостерігається велика частка гібридів і наявність лише

одиночних дорослих особин *P. ridibundus*. Більшість проаналізованих сперматоцитів та сперматид (60%) мали геном R, та лише 33% сперматоцитів та сперматид мали геном L. Це не відповідає наявним науковим уявленням, згідно з якими гібриди продукують переважно гамети із геномом виду, який відсутній в ГПС, де вони відтворюються, як це відбувається в L–E–ГПС, де гібриди передають виключно геном R (Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022).

Додатково, за результатами FISH, у п'яти самців з 52, що були досліджені, в мейотичних хромосомних пластинках зареєстровано кон'югацію між хромосомами різних видів (*P. lessonae* та *P. ridibundus*) у біваленти. При чому, у трьох таких особин спостерігалися сперматиди як з геномом *P. lessonae*, так і з геномом *P. ridibundus*, тобто такі самці були амфігаметні. Один із самців, для якого було зареєстроване явище незвичайної кон'югації, мав сперматоцити та сперматиди із геномом *P. ridibundus* та невелику кількість сперматоцитів із геномом RR. Для перевірки та пояснення цього явища, була застосована методика CGH із геномами обох батьківських видів. Щоб уникнути методологічних помилок, у якості контролю, використали двох самців, які продукували лише один тип гамет. За результати CGH зафарбування, було підтверджено, що ці самці дійсно продукували лише один тип гамет, а хромосоми із їх соматичних тканин рівномірно зафарбовувалися у кольори, що відповідають батьківським геномам, таким чином підтверджуючи гібридну природу таких особин.

Деякі хромосоми двох особин, для яких було зареєстроване явище незвичайної кон'югації хромосом різних видів, після проведеного CGH із геномами обох батьківських видів демонстрували зафарбовування різних ділянок у кольори, що є характерними для обох батьківських видів. Це може бути свідченням вдалої рекомбінації між хромосомами різних видів. Крім того, у 2 самців на препаратах після CGH можна спостерігати наявність хромосом, що не належать ані *P. lessonae*, ані *P. ridibundus*, зафарбовуючись лише DAPI. Оскільки

вірогідність методологічних помилок було нівельовано за допомогою наявності контрольних особин, висувається припущення, що ці хромосоми належать якомусь іншому виду зелених жаб, генетичний матеріал якого бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*, оскільки неодноразово було показане явище інтрогресії споріднених геномів у геноми *P. ridibundus* (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010).

У ході виконання роботи, зареєстровано шість шляхів гаметогенезу, які характерні для гібридних самців *P. esculentus*:

- 1) продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. lessonae* (L);
- 2) продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. ridibundus* (R);
- 3) продукування суміші гаплоїдних гамет, деякі з яких несуть геном L, а інші несуть геном R (феномен гібридної амфігаметності);
- 4) продукування диплоїдних гамет зі складом геномів RR, LL, LR;
- 5) продукування анеуплоїдних (кількість хромосом не кратна 13) гамет (як із геномом L, так і із геномом R);
- 6) продукування гамет із сумішшю двох або трьох геномів одночасно внаслідок взаємної рекомбінації геномів *P. lessonae*, *P. ridibundus* та, ймовірно, інтрогресії частини генетичного матеріалу ще одного виду зелених жаб.

Згідно з результатами, отриманими в ході роботи, можна зробити висновок, що наявність 14% анеуплоїдних клітин серед проаналізованих сперматоцитів та сперматид свідчить про недосконалість регуляції елімінації та ендореplikації у клітинах зародкової лінії міжвидових гібридів, як було запропоновано у сучасних дослідженнях елімінації геному у гібридів зелених жаб (Chmielewska et al., 2018). Анеуплоїдність є наслідком порушення вибіркової премейотичної елімінації одного із геномів (Ogielska et al., 2014; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020; Dedukh, Krasikova, 2022). Механізми, які забезпечують елімінацію геному у зелених жаб вивчені недостатньо. Базуючись на даних, отриманих під час досліджень механізмів елімінації у гібридних рослин (Fukagawa, Earnshaw, 2014;

Ishii et al., 2016; Musacchio, Desai, 2017; Bloom, Costanzo, 2017), можна припустити, що відмінності в кількості копій центромерного повтору в геномах різних батьківських видів можуть спричинити неправильне розташування та відставання хромосом *P. lessonae* під час розмноження гоноцитів. Наслідком цього має бути те, що у гібридних особин хромосоми *P. ridibundus* є більш здатними прикріплюватися до кінетохорів під час поділу гоноцитів, і це є причиною їх більш успішної клональної передачі у гамети (Sanei et al., 2011; Marimuthu et al., 2021).

Наукова новизна отриманих результатів полягає в отриманні даних фундаментального характеру, які пов'язані з розкриттям особливостей гаметогенезу самців зелених жаб, включаючи цитологічні аспекти амфігаметності та проявів рекомбінації. Результати досліджень роблять внесок у виявлення механізмів, що забезпечують подолання репродуктивних бар'єрів у міжвидових гібридів тварин. Розуміння цитологічних особливостей відтворення міжвидових гібридів важливе з практичної точки зору для збереження біорізноманіття інших гібридних комплексів та проведення майбутніх моніторингових та біоіндикаційних досліджень. Матеріали роботи можуть бути використані під час викладання таких навчальних курсів як «Зоологія хребетних тварин», «Цитологія та клітинна біологія», «Батрахологія та герпетологія», тощо. Зафіксований матеріал, зібраний авторкою, зберігається в колекції Лабораторії популяційної екології амфібій Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, а також у Музеї природи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

У зв'язку з повномасштабним вторгненням роботу над дисертацією було продовжено на базі Інституту фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чеська Республіка) під керівництвом д-ра Лукаса Холеви та д-ра Дмитра Дідуха; грант № RRFU-22-21 (01.05.2022 – 31.12.2023), Researchers at Risk Fellowship –

UKRAINE, наданий Чеською академією наук (the Czech Academy of Sciences (CAS)).

Ключові слова: зелені жаби, *Pelophylax*, мейоз, гаметогенез, сперматогенез, FISH, геміклональна популяційна система, диплоїд, триплоїд, хромосома, бівалент, ендоредуплікація, елімінація, поліплоїд

ANNOTATION

Pustovalova E. S. – Cytogenetic Mechanisms of Reproduction of Diploid Hybrid-Male Water Frogs (*Pelophylax esculentus*). – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the degree of Philosophy Doctor (PhD) in the field of Biology, Programme subject area – 091 Biology. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023.

The dissertation work focuses on establishing the features of gametogenesis in hybrid males of *Pelophylax esculentus* complex from hemiclinal population systems of the Siverskyi-Donets Center of Water Frog Diversity. In the course of the work, the characteristics of karyotypes and the species composition of genomes were determined in mitotic and meiotic testis cells of adult diploid males of *Pelophylax esculentus* from the investigated hemiclinal population systems (HPS) of the Siverskyi-Donets Center of Water Frog Diversity: Lower Dobrytskyi pond, Koriakiv pond, Iskiv pond (vicinity of Haidary village), floodplains of the Mozh River (vicinity of Tymchenky village). Based on the obtained data, gametogenic pathways were established in the studied hybrid males, and their contribution to maintaining the composition of hemiclinal population systems was assessed.

The author collected the material over the years 2016-2022, actively participating in the collection of samples from natural habitats of water frogs belonging to *Pelophylax esculentus* complex. A total of 762 water frogs, classified under the genus *Pelophylax*, underwent analysis. Taxonomic classification relied on a set of morphological features (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2005; Шабанов, 2015).

To determine the preliminary ploidy, erythrocyte cytometry was initially employed (Бондарева и др., 2012). Subsequently, confirmation was obtained through Ag- and DAPI-staining of chromosomes in karyological preparations (Howell, Black 1980; Birstain, 1984; Ragghianti et al., 1995; Ogielska et al., 2004; Вегерина и др.,

2013; Бірюк, 2016). Additionally, sperm cytometry was performed using samples obtained from male urinary sperm (Степаненко та ін., 2017).

The karyotyping of somatic tissues and testes was carried out using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Ragghianti et al., 1995; Pustovalova et al., 2022, 2023; Choleva et al., 2023), and in some cases, confirmation was obtained through comparative genomic hybridization (CGH) (Zalesna et al., 2011; Doležálková et al., 2016).

Based on the research results, each of the four localities is inhabited by individuals of *P. ridibundus* and *P. esculentus* (di- and triploid). Consequently, these HPSs fall into the R–E–Ep–HPS type. To comprehensively understand the mechanisms underlying successful hybrid reproduction in the water frog population systems, it is imperative to investigate the processes governing the reproduction of hybrid males. Therefore, to assess the contribution of hybrid males to the reproductive success of these systems, 52 adult males of *P. esculentus* were randomly selected (30 hybrid males from Lower Dobrytskyi Pond, 7 males from Koriakiv Pond, 8 males from the Mozh River, 7 males from Iskiv Pond).

Their gametogenesis was examined by determining the genome composition in their spermatocytes and spermatids. Using Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with Ples289 and RrS1 probes specific to the pericentromeric regions of *P. lessonae* and *P. ridibundus* chromosomes, respectively, it was revealed that out of the 52 diploid hybrid males examined, five individuals exclusively had spermatocytes and spermatids with the *P. lessonae* genome in their testes, while 13 individuals exclusively had the genome of *P. ridibundus*. For 29 individuals, the *P. lessonae* genome was observed in some spermatocytes and spermatids, while the *P. ridibundus* genome was present in others; following our proposed terminology, these individuals are classified as amphigametic. Additionally, diploid spermatocytes and single diploid spermatids were recorded in the testicles of another 8 out of the 52 males examined.

Despite the prevalent transmission of R genomes by hybrids in the investigated HPS, a substantial number of hybrids and the presence of only single adults of *P. ridibundus* are observed in these HPS every year. The majority of analyzed spermatocytes and spermatids (60%) exhibited the R genome, while only 33% showed the L genome. This contradicts the current scientific understanding that hybrids predominantly produce gametes with the genome of a species absent from the host where they reproduce. This pattern is typically observed in L–E–HPS, where hybrids exclusively transmit the R genome (Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022).

Additionally, based on the FISH results, pairing between chromosomes of different species (*P. lessonae* and *P. ridibundus*) in bivalents was observed in meiotic metaphases in five out of the 52 examined males. Furthermore, three of these individuals exhibited spermatids with both *P. lessonae* and *P. ridibundus* genomes, classifying them as amphigametic. One of the males, for whom the unusual pairing phenomenon was reported, displayed spermatocytes and spermatids with the *P. ridibundus* genome and a small number of spermatocytes with the RR genome.

To verify and explain this phenomenon, the Comparative Genomic Hybridization (CGH) technique was applied using the genomes of both parental species. To minimize methodological errors, two males that produced only one type of gametes were used as controls. The results of the CGH staining confirmed that these control males indeed produced only one type of gamete. The chromosomes from their somatic tissues uniformly stained in colors corresponding to the parental genomes, thus confirming the hybrid nature of such individuals.

After performing CGH with the genomes of both parental species on two individuals, for which the unusual pairing of chromosomes from different species was observed, certain chromosomes displayed staining in different areas with colors characteristic of both parental species. This observation suggests potential evidence of successful recombination between chromosomes of different species.

Additionally, in two males, chromosomes that did not belong to either *P. lessonae* or *P. ridibundus* were identified in preparations after CGH, showing staining only with DAPI. Given the presence of control individuals to minimize the probability of methodological errors, it is proposed that these chromosomes belong to some other species of water frogs. It is speculated that the genetic material of this unidentified species is involved in the hybridization of *P. lessonae* and *P. ridibundus*, as the phenomenon of introgression of related genomes into *P. ridibundus* genomes has been previously demonstrated (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010).

During the course of the study, six distinct modes of gametogenesis were identified, characteristic of hybrid males of *P. esculentus*:

1. Production of haploid gametes with the genome of *P. lessonae* (L).
2. Production of haploid gametes with the genome of *P. ridibundus* (R).
3. Production of a mixture of haploid gametes, where some carry the L genome, and others carry the R genome (referred to as the phenomenon of hybrid amphigameticity).
4. Production of diploid gametes with RR, LL, and LR genome compositions.
5. Production of aneuploid gametes (with the number of chromosomes not being a multiple of 13), both with the L genome and the R genome.
6. Production of gametes with a mixture of two or three genomes simultaneously, resulting from the mutual recombination of the genomes of *P. lessonae*, *P. ridibundus*, and potentially the introgression of genetic material from another species of water frogs.

Based on the results obtained during this study, it can be concluded that the presence of 14% aneuploid cells among the analyzed spermatocytes and spermatids indicates imperfections in the regulation of elimination and endoreplication in the germ cells of interspecies hybrids. This aligns with contemporary studies on the elimination of genomes in water frog hybrids (Chmielewska et al., 2018). Aneuploidy is considered a consequence of selective premeiotic elimination of one of the genomes (Ogielska et al., 2014; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020; Dedukh, Krasikova, 2022).

The mechanisms governing genome elimination in water frogs have not been extensively studied. Drawing insights from the study of elimination mechanisms in hybrid plants (Fukagawa, Earnshaw, 2014; Ishii et al., 2016; Musacchio, Desai, 2017; Bloom, Costanzo, 2017), it can be hypothesized that differences in the number of centromeric repeat copies in the genomes of different parental species may lead to misalignment and lagging of *P. lessonae* chromosomes during gonocyte multiplication. Consequently, in hybrid individuals, *P. ridibundus* chromosomes may have a higher propensity to attach to kinetochores during gonocyte division, contributing to their more successful clonal transfer to gametes (Sanei et al., 2011; Marimuthu et al., 2021).

The scientific novelty of the obtained results lies in the acquisition of fundamental data pertaining to the elucidation of male water frog gametogenesis, encompassing cytological aspects of amphigameticity and manifestations of recombination. The research outcomes contribute significantly to understanding the mechanisms that facilitate the overcoming of reproductive barriers in interspecies hybrid animals. This comprehension of cytological features in the reproduction of interspecies hybrids holds practical importance for preserving biodiversity within other hybrid complexes and for conducting future monitoring and bioindicative studies.

The materials from this study can be utilized in the teaching of educational courses such as “Zoology of Vertebrate Animals”, “Cytology and Cell Biology”, “Batrachology and Herpetology” etc. The recorded material, collected by the author, is stored in the collection of the Laboratory of Amphibian Population Ecology at V. N. Karazin Kharkiv National University, as well as in the Nature Museum of V. N. Karazin Kharkiv National University.

Due to the full-scale invasion, work on the dissertation continued at the Institute of Animal Physiology and Genetics in Libechov, Czech Republic. The work was performed under the supervision of Dr. Lukas Choleva and Dr. Dmytro Didukh, supported by grant No. RRFU-22-21 (05/01/2022 - 12/31/2023) as part of the

Researchers at Risk Fellowship – UKRAINE, provided by the Czech Academy of Sciences (CAS).

Keywords: water frogs, *Pelophylax*, *Pelophylax esculentus*, meiosis, gametogenesis, spermatogenesis, FISH, hemiclonal population system, diploid, triploid, chromosome, bivalent, endoreduplication, elimination, polyploid