

Uniwersytet Wrocławski
Wydział Nauk Biologicznych

**Eliminacja genomów w komórkach gametogenicznych
u hybrydogenetycznych mieszańców żab wodnych
(*Pelophylaxesculentus* complex)**

Mikołaj Kaźmierczak
Mikołaj Kaźmierczak

Wrocław 2022

Streszczenie

Hybrydyzacja międzygatunkowa, czyli krzyżowanie się osobników należących do dwóch odrębnych gatunków, nie jest zjawiskiem rzadkim. Żaba wodna (*Pelophylaxesculentus*) to podniesiony do rangi gatunku płodny mieszaniec, który powstał poprzez skrzyżowanie się dwóch gatunków rodzicielskich: żaby jeziorkowej (*P. lessonae*) o genotypie LL i żaby śmieszki (*P. ridibundus*) o genotypie RR. Te trzy gatunki współtworzą kompleks żab zielonych (*Pelophylaxesculentus*complex). W Polsce żaby wodne występują w dwóch formach somatycznej ploidii: dominującej diploidalnej ($2n=26$ chromosomów, genotyp RL) i rzadziej spotykanej triploidalnej ($3n=39$ chromosomów, genotypy RRL i RLL).

Mieszaniec żaby wodnej powstaje na drodze hybrydogenezy, na którą składa się szereg zdarzeń natury molekularnej i cytogenetycznej prowadzących do głębokich przemian genomowych w komórkach linii płciowej zarówno samic, jak i samców. Modelowy scenariusz hybrydogenezy u osobników diploidalnych zakłada, że w gonocytach, w toku podziałów mitotycznych, dochodzi do całkowitej eliminacji genomu jednego gatunku rodzicielskiego (najczęściej *lessonae*-L), a następnie endoreplikacji genomu drugiego gatunku (*ridibundus*-R). W konsekwencji do gamet zostaje przekazany klonalny genom R.

W badaniach uwzględniono następujące założenia: 1) głębokie przemiany genomowe (eliminacja i endoreplikacja) zachodzą podczas okresu mitotycznego namnażania się gonocytów we wczesnej fazie rozwoju gonad; 2) mikrojądra są nośnikami eliminowanych chromosomów oraz zdefiniowano hipotezy badawcze: 1) pierwotne komórki płciowe (PGC) oraz gonocyty (G) w gonadach niezróżnicowanych mają taki sam skład genomowy, jak komórki somatyczne badanego osobnika (RL, RRL, RLL); 2) gonocyty z wczesnych stadiów gonad zróżnicowanych płciowo charakteryzują się zróżnicowaną kompozycją chromosomów R i L; 3) komórki macierzyste plemników (SSC) u osobników dojrzałych płciowo zawierają chromosomy tylko jednego gatunku rodzicielskiego (RR lub LL).

Główne cele pracy obejmowały: 1) zbadanie składu genomowego komórek linii płciowej poszczególnych etapów gametogenezy (spermatogenezy i oogenezy); 2) ustalenie, czy eliminacja i endoreplikacja to procesy jedno-, czy wieloetapowe, czy zachodzą raz, czy wielokrotnie w ciągu życia osobnika; 3) zbadanie, czy gonocyty z jednej gonady realizują podobny scenariusz hybrydogenetyczny, czy może występują populacje różniące się eliminowanym genomem; 4) analizę organizacji przestrzennej genomów gatunków rodzicielskich w gonocytach interfazowych; 5) ustalenie, czy przemiany genomowe w gonocytach należących do jednej gonady przebiegają w sposób zsynchronizowany, czy nie;

6) określenie, czy mechanizmy cytogenetyczne leżące u podstaw hybrydogenezy są dokładne i nie powodują błędów w składzie genomowym; 7) przeanalizowanie, czy wśród mieszańców dominują osobniki produkujące wyłącznie jeden typ gamet, czy są również takie, które wytwarzają dwa i więcej typów.

Analizie cytogenetycznej w postaci genomowej hybrydyzacji *in situ* w oparciu o genom *ridibundus* i centromerową sekwencję repetytywną RrS1 poddano 1020 komórek metafazowych i interfazowych 41 osobników diploidalnych RL, 679 komórek 17 osobników triploidalnych RLL i 393 komórki 12 osobników triploidalnych RRL.

Badania przeprowadzono na komórkach linii płciowej kijanek od wczesnych stadiów rozwoju osobniczego-premetamorfozy (niezróżnicowane gonady, pierwotne komórki płciowe o zakładanym składzie genomowym RL), poprzez prometamorfozę, aż do stadium klimaksu (różnicowanie się gonad i ich rozwój, intensywne podziały mitotyczne gonocytów, etap głębokich, strukturalnych przemian genomowych) oraz na osobnikach postmetamorficznych (juwenilnych) i dorosłych (samców), których komórki macierzyste miały zawierać zakładany, ujednolicony skład genomowy (RR lub LL).

W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono, że: 1) pregametogeneza (u kijanek) i gametogeneza aktywna (u dorosłych żab) to dwa różne etapy; 2) procesy eliminacji i endoreplikacji chromosomów rodzicielskich przebiegają wyłącznie w gonocytach (G) podczas pregametogenezy i nie występują już w komórkach gametogenezy aktywnej; 3) zdarzenia cytogenetyczne leżące u podstaw hybrydogenezy zachodzą jednorazowo w ciągu życia mieszańca podczas pregametogenezy; 4) chromatyna gatunków rodzicielskich w gonocytach interfazowych *P. esculentus*, przed rozpoczęciem etapu odrzucania DNA, nie ulega segregacji przestrzennej; 5) eliminacja i endoreplikacja są dwoma niezależnymi od siebie mechanizmami, o czym świadczą haploidalne komórki macierzyste SCs i gametogonia wtórne wyłącznie z chromosomami R (eliminacja bez endoreplikacji) i komórki tetraploidalne RRLL (endoreplikacja bez eliminacji); 6) w przeciwieństwie do eliminacji DNA, endoreplikacja wydaje się fazą obligatoryjną, by w procesie hybrydogenezy doprowadzić do powstania żywotnych gamet (duplikacja komórek RL rekompensuje brak eliminacji, ponieważ podniesienie ploidii do poziomu 4n-RRLL może skutkować produkcją dwóch typów plemników R i L); 7) gonocyty składające się na gonady danego osobnika nie przechodzą hybrydogenezy w sposób zsynchronizowany, ponieważ każdy z nich może się znajdować na odmiennym etapie rearanżacji chromosomowych; 8) gonocyty tej samej gonady mogą realizować odmienne scenariusze hybrydogenezy; 9) hybrydogenetyczną spermatogenezę należy ocenić jako proces niedoskonały; 10) wachlarz wariantów

chromosomowych w komórkach linii płciowej, w szczególności komórek macierzystych SSC u samców, znacznie przewyższał ten obserwowany w plemnikach (oznacza to, że część komórek ulegała degeneracji).

University of Wrocław
Faculty of Biological Sciences

**Elimination of genomes in gametogenic cells
of the hybridogenetic water frog hybrids
(*Pelophylaxesculentus* complex)**

Mikołaj Kaźmierczak
Mikołaj Kaźmierczak

Wrocław 2022

Summary

Interspecies hybridization is not an uncommon phenomenon. The edible frog (*Pelophylax esculentus*) is a hybridogenetic hybrid elevated to a full species. It emerged from a crossing between two parental species: the pool frog (*P. lessonae*)-genotype LL and the marsh frog (*P. ridibundus*)-genotype RR. All three species form the *Pelophylax esculentus* complex. Two somatic forms of hybrid's ploidy occur in Poland: widely distributed diploids ($2n=26$ chromosomes, genotype RL) and less common triploids ($3n=39$ chromosomes, genotypes RLL and RRL).

Hybrids arise as a result of hybridogenesis. This process includes a series of molecular and cytogenetical events resulting in extensive genomic rearrangements in germ line cells of both females and males. Exemplary scenario of hybridogenesis in diploid specimens assumes that in gonocytes, during the course of mitotic divisions, one genome (mostly *lessonae*-L) is completely eradicated from germ cells and the remaining one (*ridibundus*-R) is endoreplicated and clonally transmitted into gametes.

The following research assumptions were made: 1) extensive genomic rearrangements (elimination and endoreplication) occur during mitotic multiplication of gonocytes in the early stages of gonadal development; 2) micronuclei are the carriers of chromatin subjected to degradation. In turn, research hypotheses include that: 1) genomic composition of primordial germ cells (PGC) and gonocytes (G) of undifferentiated gonads reflects the genomic composition of somatic cells of the same specimen; 2) gonocytes from differentiated gonads have varied composition of R and L chromosomes; 3) spermatogonial stem cells (SSC) of future spermatozoa contain chromosomes of only one parental species (R or L).

The main research objectives included: 1) analysis of genomic composition of the germ line cells from different stages of gametogenesis (spermatogenesis and oogenesis); 2) demonstrating if elimination and endoreplication are single or multistage events; 3) checking if both processes occur once or several times throughout the individual's life; 4) examining if gonocytes of one gonad follow the same hybridogenetical scenario or there are some populations of cells differing in genomic exclusion; 5) analysis of spatial distribution of parental genomes in interphase nuclei; 6) determining if genomic rearrangements in gonocytes of one gonad are synchronized or not; 7) examining if cytogenetical mechanisms underlying hybridogenesis are precise and do not result in genomic errors; 7) analysis of types of spermatozoa (in terms of genomic composition) produced by males.

1020 metaphase and interphase cells belonging to 41 diploid specimens RL, 679 cells of 17 triploid RLL and 393 cells of 12 triploid RRL individuals were analyzed by genomic *in situ* hybridization based on *ridibundus*-derived whole genomic probe enriched with the centromeric repetitive sequence RrS1 probe.

Germ line cells from different stages of gonadal development (premetamorphosis with undifferentiated gonads, prometamorphosis and climax with gonadal differentiation in tadpoles up to postmetamorphic juvenile and adult specimens) were subjected to research.

As a result of the research it was confirmed that: 1) pregametogenesis (in tadpoles) and active gametogenesis (in adults) are separated in time; 2) elimination and endoreplication of chromosomes are limited entirely to mitotic multiplication of gonocytes (G) during pregametogenesis and do not occur in active gametogenesis; 3) cytogenetical events underlying hybridogenesis take place only once throughout the individual's life during pregametogenesis; 4) chromatin of both parental species is not spatially segregated in interphase gonocytes of *P. esculentus* before elimination stage; 5) elimination and endoreplication are two independent mechanisms as evidenced by numerous haploid gametogonial stem cells and secondary gametogonia containing only R chromosomes (elimination without endoreplication) and tetraploid stem cells RRLl (endoreplication without elimination); 6) in contrast to DNA exclusion, endoreplication phase seems to be crucial to fulfil hybridogenesis and produce viable gametes (duplication of RL chromosome sets compensates the lack of elimination, because ploidy elevation to 4n-RRLl may result in the production of two types of spermatozoa R and L); 7) gonocytes of the same gonad go through hybridogenesis asynchronously, because some of them may still present RL sets of chromosomes, others may proceed to elimination or endoreplication and still others may have chromosomal rearrangements accomplished; 8) gonocytes of the same gonad may follow different scenario of hybridogenetical events and eradicate L or R genomes simultaneously; 9) elimination and endoreplication mechanisms are far from being accurate; 10) range of chromosomal compositions of germ line cells, especially spermatogonial stem cells in males, exceeded the one observed in spermatozoa, which means that part of the cells must have been subjected to degeneration.