

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

На правах рукописи

БИКЧУРИНА ТАТЬЯНА ИГОРЕВНА

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СТЕРИЛЬНОСТИ У
ГИБРИДОВ МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ ВИДАМИ
СЕМЕЙСТВА ХОМЯКОВЫЕ (CRICETIDAE)**

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д. б. н., проф. П.М.Бородин

НОВОСИБИРСК – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
Актуальность проблемы	9
Цель и задачи работы	10
Научная новизна работы	10
Научно-практическая ценность работы	11
Основные положения, выносимые на защиту	11
Личный вклад автора	11
Апробация работы	12
Публикации	12
Структура и объем работы	12
Благодарности	13
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1 Основные процессы гаметогенеза	14
1.1 Введение	14
1.2 Сперматогенез	15
1.3 Вступление клетки зародышевого пути в фазу мейоза	17
1.4 Основные события фазы мейоза	17
2 Роль генетических и кариотипических факторов в формировании гибридной стерильности	21
2.1 Роль систем контрольных точек мейоза в формировании гибридной стерильности	21
2.2 Роль генетической дивергенции в формировании гибридной стерильности	24
2.3 Роль хромосомных перестроек в формировании гибридной стерильности	27
2.4 Роль половых хромосом в формировании гибридной стерильности	31
2.5 Роль нарушений синапсиса и рекомбинации в псевдоаутосомном районе (ПАР) в формировании гибридной стерильности	32

3 Обоснование модели и методов	33
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
Животные	39
Получение окрашенных парафиновых срезов и гистологический анализ	39
Детекция апоптотических клеток с использованием метода TUNEL	41
Приготовление препаратов распластанных хромосом. Иммуноокрашивание	41
Электронная микроскопия препаратов распластанных хромосом	42
С-подобное окрашивание DAPI для выявления С-конститутивного гетерохроматина	43
G-окрашивание	43
Получение Cot-10 ДНК	43
Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация (FISH)	44
Статистический анализ	44
РЕЗУЛЬТАТЫ	46
1 Гибридная стерильность у представителей рода <i>Alexandromys</i> , триба Arvicolini	46
1.1 Гистологический анализ гибридов рода <i>Alexandromys</i>	47
1.1.1 Особенности сперматогенеза у внутривидовых гетерозигот по хромосомным перестройкам	47
1.1.2 Особенности сперматогенеза у межвидовых гибридов <i>A. maximowiczii</i> , <i>A. tujanensis</i> и <i>A. evoronensis</i>	47
1.2 Цитогенетический анализ гибридов рода <i>Alexandromys</i>	50
1.2.1 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов <i>A. maximowiczii</i> , <i>A. tujanensis</i> и <i>A. evoronensis</i> , гетерозиготных по хромосомным перестройкам	50
1.2.2 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межрасовых гибридов <i>A. evoronensis</i>	59
1.2.3 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов	60
2 Гибридная стерильность у представителей подрода <i>Microtus</i> , триба Arvicolini	64

2.1 Гистологический анализ гибридов подрода <i>Microtus</i>	65
2.1.1 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. rossiaemeridionalis</i>	65
2.1.2 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. mystacinus</i>	68
2.1.3 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов <i>M. rossiaemeridionalis</i> и <i>M. mystacinus</i>	68
2.1.4 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов <i>M. arvalis</i> и <i>M. kermanensis</i>	69
2.1.5 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. transcaspicus</i>	69
2.2 Цитогенетический анализ гибридов подрода <i>Microtus</i>	70
2.2.1 Сравнение кариотипов <i>M. rossiaemeridionalis</i> и <i>M. mystacinus</i>	70
2.2.2 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов родительских видов подрода <i>Microtus</i>	72
2.2.3 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. rossiaemeridionalis</i>	72
2.2.4 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. mystacinus</i>	73
2.2.5 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов <i>M. rossiaemeridionalis</i> и <i>M. mystacinus</i>	74
2.2.6 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов <i>M. arvalis</i> и <i>M. kermanensis</i>	77
2.2.7 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов <i>M. kermanensis</i> и <i>M. transcaspicus</i>	78
3 Гибридная стерильность у представителей рода <i>Phodopus</i>	78
3.1 Гистологический анализ гибридов рода <i>Phodopus</i>	79
3.2 Цитогенетический анализ гибридов рода <i>Phodopus</i>	81
3.2.1 Синапсис и рекомбинация аутосом	81
3.2.2 Синапсис и рекомбинация полового бивалента XY	87

3.2.3 Синапсис и рекомбинация полового бивалента XX	90
ОБСУЖДЕНИЕ	93
1 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода <i>Alexandromys</i>	93
1.1 Межвидовые гибриды стерильны, тогда как внутривидовые гибриды демонстрируют показатели сперматогенеза, сравнимые с родительскими видами	93
1.2 Асинапсис является основной причиной мейотического ареста и, как следствие, стерильности у межвидовых гибридов.....	94
1.3 У межвидовых гибридов асинапсис гомологичных хромосом обусловлен сложной гетерозиготностью по серии хромосомных перестроек	96
1.4 Влияние хромосомных перестроек на синапсис и рекомбинацию хромосом у внутривидовых гибридов <i>A. evoronensis</i>	96
1.5 Хромосомный полиморфизм у видов группы « <i>maximowiczii</i> », по-видимому, нейтрален.....	98
1.6 Кариотипическая дивергенция способствует видообразованию в группе видов « <i>maximowiczii</i> »	99
2 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода <i>Microtus</i>	100
2.1 Степень нарушений сперматогенеза у гибридов возрастает с увеличением генетической дистанции между родительскими видами.....	100
2.2 Основная причина остановки мейоза у гибридов рода <i>Microtus</i> связана с асинапсисом хромосом	103
2.3 Межвидовые гибридные самцы группы « <i>mystacinus</i> » стерильны, что связано преимущественно с генетической дивергенцией	105
3 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода <i>Phodopus</i>	107
3.1 Основная причина стерильности самцов гибридов типа <i>B</i> связана с нарушением синапсиса половых хромосом.....	107
3.2 Нарушение мейотической и постмейотической инактивации генов ПАР является вероятной причиной стерильности самцов гибридов карликовых хомячков рода <i>Phodopus</i>	109

3.3 Гетерохроматиновый блок на Хr ускоряет межвидовую дивергенцию ПАР	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПАР – псевдоаутосомный район

РК – ретиновая кислота

СК – синаптонемный комплекс

сМ – сантиморган

ССК – сперматогониальные стволовые клетки

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АСА – anti-centromere antibodies (комплекс центромерных белков)

АМСА – 7-amino-4-methyl coumarin-3-acetic acid (7-амино-4-метил кумарин-3-уксусная кислота)

BSA – bovine serum albumin (бычий сывороточный альбумин)

СуЗ – цианин-3

Cot – гибридизационная смесь немеченой ДНК повторов, используемая для флуоресцентной гибридизации *in situ*

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol (4,6,-диамидино-2-фенилиндол)

dpс – days post conception (дней после оплодотворения)

FN – fundamental number (число хромосомных плеч)

FNa – fundamental autosomal number (фундаментальное число аутосом)

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*)

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеинизотиоционат)

MLH1 – mutL homolog 1 (белок мисс-матч репарации)

MSCI – meiotic sex chromosome silencing (мейотический сайленсинг половых хромосом)

MSUC – meiotic silencing of unpaired chromatin (мейотический сайленсинг несинаптированного хроматина)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

PBT – phosphate buffer with Tween-20 (фосфатный буфер с детергентом)

SDS – sodium dodecyl sulfate (додецил сульфат натрия)

SSC – saline sodium citrate (стандартный цитратно-солевой раствор)

SYCP3 – synaptonemal complex protein 3 (белок латерального элемента синаптонемного комплекса)

TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (реакция мечения двухцепочечной ДНК с выступающим одноцепочечным 3'-ОН концом, катализируемая терминальной дезоксинуклеотид трансферазой)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

На ранних этапах видообразования одним из механизмов формирования репродуктивной изоляции у млекопитающих является генетическая несовместимость изолированных популяций. Генетическая несовместимость может быть обусловлена несовместимостью аллельных вариантов одного или нескольких генов, потерей гомологии нуклеотидных последовательностей, а также «перетасовкой» генетического материала вследствие накопления хромосомных перестроек. Совокупность этих факторов приводит к формированию гибридной стерильности, которая является важным механизмом репродуктивной изоляции и часто характеризуется нарушениями синапсиса и рекомбинации гомологичных хромосом в первой профазе мейоза (Oka et al., 2010; Bhattacharyya et al., 2013; Torgasheva and Borodin, 2016). Однако остается не ясным, как степень данных нарушений зависит от филогенетического расстояния, кариотипической дивергенции родительских таксонов, а также полиморфизма по хромосомным перестройкам в исходной популяции.

В настоящее время большое внимание уделяется поиску исходных причин нарушений гаметогенеза, приводящих к возникновению стерильности у гибридов. Основным объектом для большинства подобных исследований являются лабораторные линии мышей *Mus musculus musculus* и *Mus musculus domesticus*. Это затрудняет экстраполяцию полученных данных и гипотез формирования репродуктивной изоляции между близкородственными видами/подвидами на млекопитающих природных популяций.

В данной работе с применением классического метода гистологического анализа и иммунолокализации ключевых белков мейоза было проведено описание различных фенотипов гибридной стерильности у внутривидовых и межвидовых гибридов Хомяковых. Мы оценивали гибридную стерильность по нарушениям сперматогенеза.

Семейство Хомяковые (Cricetidae), подсемейства Полёвки (Arvicolinae) и Хомяки (Cricetinae), а именно – рода *Alexandromys*, *Microtus* и *Phodopus*, – представляют собой удобный неклассический модельный объект для изучения цитологических и молекулярных механизмов формирования гибридной стерильности на ранних этапах видообразования. Выбранные для исследования виды различаются по темпам фиксации хромосомных перестроек, наличию/отсутствию хромосомного полиморфизма и времени расхождения близкородственных видов. Время дивергенции среди выбранных видов полевок составляет не более 0.25 млн лет (Bannikova et al., 2010; Mahmoudi et al., 2017), тогда как

близкородственные виды мохноногих хомячков *Phodopus* дивергировали около 1 млн лет назад (Neumann et al., 2006).

Исследование особенностей гаметогенеза у таких гибридов представляется важным для оценки роли генной и хромосомной дивергенции в постепенном формировании гибридной стерильности.

Цель и задачи работы

Целью данной работы было выявление цитогенетических механизмов формирования стерильности у гибридов между близкими видами Хомяковых, различающимися по степени генетической и кариотипической дивергенции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить возможные нарушения сперматогенеза, синапсиса и рекомбинации хромосом у внутривидовых гибридов между представителями хромосомных рас *A. evoronensis*, а также у межвидовых гибридов полевков *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* и *A. evoronensis*, которые характеризуются высоким уровнем хромосомного полиморфизма, числом и типом накопленных хромосомных перестроек.

2. Выявить возможные нарушения сперматогенеза, синапсиса и рекомбинации хромосом у межвидовых гибридов между близкородственными видами полевков европейской линии *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. mystacinus*, *M. arvalis* «obscurus» и *M. transcaspicus*, различающимися по времени дивергенции и числу накопленных хромосомных перестроек.

3. Провести анализ синапсиса и рекомбинации аутосом и половых хромосом у стерильных самцов и фертильных самок гибридов двух близкородственных видов мохноногих хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli* и родительских видов, кариотипы которых идентичны. У самцов гибридов и родительских видов провести анализ сперматогенеза.

Научная новизна работы

Впервые получены подробные данные о вариации фенотипов гибридной стерильности у представителей родов *Alexandromys* и *Microtus*. Установлено, что степень нарушений синапсиса хромосом гибридов серых полевков соотносится с временем дивергенции близкородственных видов, однако уровень рекомбинации при этом остается сравнимым с родительскими группами, если гаметоциты достигают пахитено-подобной стадии в своем развитии. Впервые показали, что накопление хромосомных перестроек разных типов в небольших изолированных популяциях было основным механизмом

видообразования для полевок рода *Alexandromys*, в отличие от полевок подрода *Microtus*, где значимый вклад в формирование репродуктивной несовместимости внесла генетическая дивергенция. Впервые предложен механизм формирования гибридной стерильности между *P. sungorus* и *P. campbelli*, связанный с особенностями кариотипа родительских видов. Показано, что высокая частота асинапсиса половых хромосом у самцов межвидовых гибридов приводит к остановке мейоза, что, в свою очередь, является основной причиной гибридной стерильности у хомячков рода *Phodopus*.

Научно-практическая ценность работы

Результаты данной работы расширяют представления о цитогенетических механизмах формирования гибридной стерильности. Полученные в работе данные о вкладе генетической и кариотипической дивергенции в контексте популяционного полиморфизма по хромосомным перестройкам у млекопитающих могут быть использованы для дополнения и улучшения современных моделей видообразования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Значимой частью общего механизма формирования стерильности у гибридов между близкородственными видами Хомяковых является полный асинапсис хромосом или асинапсис их отдельных районов, который может приводить к остановке сперматогенеза или формированию аберрантных нефункциональных гамет.

2. Асинапсис хромосом может быть обусловлен как продолжительностью независимой эволюции родительских таксонов, так и кариотипическими особенностями родительских видов.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно готовил препараты распластанных синаптонемных комплексов (СК) большей части представителей серых полевок и карликовых хомячков, проводил иммуноокрашивание, С-подобное окрашивание DAPI для выявления С-конститутивного гетерохроматина, выделение ДНК, приготовление Cot-10 ДНК, используемой для флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), сбор и фиксацию клеточной культуры *M. mystacinus*, приготовление гистологических срезов, включая фиксацию, заливку, работу на микротоме и окрашивание гематоксилином и эозином большей части образцов полевок, получение подавляющего числа микрофотографий на световом и флуоресцентном микроскопах, фотографирование части препаратов на электронном микроскопе, цифровую обработку изображений, измерение основных рекомбинационных

характеристик и анализ полученных экспериментальных данных. FISH, приготовление препаратов распластанных метафазных хромосом и G-окрашивание проводилось С.А. Романенко на базе ИМКБ СО РАН. Гистологический анализ представителей рода *Phodopus* и части образцов родов *Alexandromys* и *Microtus* был проведен Е.А. Кизиловой, ИЦиГ СО РАН. Выращивание клеточной культуры из межреберной ткани *M. mystacinus* проводилось И.Е. Пристяжнюк, ИЦиГ СО РАН. Карликовые хомячки были любезно предоставлены Е.А. Кизиловой, полевки были любезно предоставлены сотрудником лаборатории эволюционной зоологии и генетики ФИЦ Биолого-почвенного института ДВО РАН И.В. Картавцевой и сотрудником лаборатории териологии Зоологического института РАН Ф.Н. Голенищевым.

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены: на 22ой международной конференции ICACG (Тулуза, Франция, 2016), на 22ой юбилейной международной конференции ESDAR (Кордоба, Испания, 2018), на международной конференции EMBO, посвященной мейозу «Workshop on Meiosis» (Ла Рошель, Франция, 2019), на 13ой международной Европейской цитогенетической конференции ECC (онлайн, 2021), на 18ой Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2021), на 11ом съезде Териологического общества при РАН (Москва, 2022), на 13ой международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии BGRS\SB (Новосибирск, 2022), на 4ой международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2022).

Публикации

Материал диссертации представлен в 11 публикациях, в том числе в 3 статьях в международных (3) рецензируемых журналах.

Структура и объем работы

Работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список цитированной литературы (285 источников). Общий объем работы составляет 141 страницу. Представлено 23 рисунка и 10 таблиц.

Благодарности

Автор искренне признателен научному руководителю П.М. Бородину за руководство и обучение многим полезным навыкам научной работы цитогенетика, а также за фотографирование части образцов на электронном микроскопе; А.А. Торгашевой за научное руководство в период бакалавриата и магистратуры, многочисленные часы рецензирования текстов всех дипломных работ и диссертации, обучение навыку осмысления научной информации и содержательные научные дискуссии; М.И. Родионовой за помощь в приготовлении препаратов распластанных СК некоторых представителей карликовых хомячков и серых полевков; Л.П. Малиновской за поддержку и помощь в экспериментах, а также многочисленные научные консультации; Д.В. Рубцовой за участие в обработке части данных полевков рода *Alexandromys*, Я.А. Цепилову за консультацию в решении нестандартных статистических задач; коллективу лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа за физическую, техническую и моральную поддержку, помощь в организации экспериментов и интерпретации результатов; сотруднику ЦКП ИЦиГ СО РАН Е.А. Кизиловой за моральную поддержку и помощь в приготовлении части гистологических препаратов, обучение методам гистологического анализа и любезное предоставление биологического материала; сотрудникам лаборатории эволюционной зоологии и генетики ФИЦ Биолого-почвенного института ДВО РАН, в особенности И.В. Картавцевой, И.Н. Шереметьевой, М.В. Павленко и Т.В. Васильевой, и сотрудникам лаборатории териологии Зоологического института РАН, в особенности Ф.Н. Голенищеву, за предоставление животных и помощь в получении биологического материала; сотруднику лаборатории сравнительной геномики Института Молекулярной и Клеточной Биологии К.В. Тишаковой за совместное начало исследования гибридов хомячков рода *Phodopus*; сотруднику лаборатории цитогенетики животных Института Молекулярной и Клеточной Биологии С.А. Романенко за помощь в проведении FISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*) на наших препаратах распластанных СК карликовых хомячков, приготовлении препаратов метафазных хромосом, помощь в проведении G-окрашивания и консультации по раскладке хромосом; сотруднику лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН И.Е. Пристяжнюк за помощь в выращивании клеточной культуры из межреберной ткани *M. mystacinus* и обучение методу фиксации клеточной культуры; ЦКП микроскопического анализа биологических объектов за предоставление доступа к микроскопическому оборудованию. Автор также весьма признателен Кевину Арджилесу за продуктивное и наполненное жизнью участие в проекте с хомячками рода *Phodopus*; студентам второго курса ФЕН НГУ Софье Никитиной, Ульяне

Шишковой, Маргарите Найдановой, Софье Козыревой, Софье Ефстифеевой, Дарье Савенковой, Марии Шальной, Татьяне Зыковой, Дарье Рубцовой, Василисе Будник, Евгении Поздняковой, Андрею Воронину, Еве Межлумян, Березуцкой Екатерине, Самойловой Елизавете, Жакуповой Юлии, Одноприенко Дарье и Сабуровой Полине, проходившим у автора летнюю практику по курсу «Цитология», за плодотворное переосмысление научных проблем диссертационной работы, прекрасные отчеты по итогу практики и креативное участие в большом количестве моих пилотных проектов, что весьма вдохновляло автора на дальнейшую работу; членам коллектива лаборатории борнейтронозахватной терапии злокачественных опухолей ИЯФ СО РАН М.И. Бикчуриной и Я.А. Колесникову за многолетнюю практику переложения комплексных цитогенетических механизмов видообразования и гибридной стерильности на популяризаторский язык, что поднимало автору уровень понимания глобальной проблемы работы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 Основные процессы гаметогенеза

1.1 Введение

Видообразование – это комплексный процесс, на который оказывают влияние множество различных факторов. На ранних стадиях видообразования происходит формирование репродуктивной изоляции между популяциями, механизмы которой можно разделить на предзиготические и постзиготические. В случае, если копуляция происходит, в формировании репродуктивной изоляции становятся задействованными механизмы постзиготической изоляции: несовместимость гибридов до или после оплодотворения (не происходит образования зиготы или зигота быстро погибает), нежизнеспособность гибридов (потеря эмбриона или постнатальная смертность), гибридная стерильность (нарушения гаметогенеза) и разрушение гибридов (сниженная жизнеспособность рекомбинантов или стерильность потомков гибридов). Данные механизмы могут ограничивать или предотвращать поток генов между новообразующимися видами.

Станковски и Равинет (2021) проанализировали все современные существующие взгляды на концепцию видообразования и предложили формальное определение «континуума видообразования» или видообразования в целом, основанное на вариации степени репродуктивной изоляции между парами популяций. Репродуктивная изоляция выступает в качестве одномерного показателя, который основан на популяционно-генетической теории и предназначен для измерения снижения потока генов между

популяциями вследствие увеличения генетических различий (Kobayashi and Telschow, 2011).

Одним из важнейших и наиболее распространенных механизмов репродуктивной изоляции у млекопитающих является гибридная стерильность. Цитологические и молекулярные механизмы формирования гибридной стерильности на ранних стадиях видообразования могут различаться у видов с разным временем дивергенции, при этом у одного вида степень стерильности может варьировать в зависимости от половой принадлежности. Гибридная стерильность может возникать из-за генной, хромосомной и геномной несовместимости родительских форм, что чаще всего отражается на прохождении гаметогенеза.

Способность к половому размножению является одним из основных признаков большинства эукариот. Ключевой особенностью полового размножения является мейоз, специализированный клеточный цикл, в котором один раунд репликации ДНК предшествует двум раундам сегрегации хромосом с образованием гаплоидных гамет. У большинства организмов мейотическая сегрегация хромосом зависит от спаривания, синапсиса и кроссинговера гомологичных хромосом в ходе профазы I (Hunter, 2003; Handel and Schimenti, 2010). В данной работе будут рассмотрены особенности сперматогенеза у представителей класса Млекопитающие с основным акцентом на события стадии мейоза.

1.2 Сперматогенез

У млекопитающих сперматогенез – это процесс формирования гамет у самцов, который начинается в период полового созревания и может длиться все остальное время жизни. Сперматогенез происходит в семенниках, органе, в котором различают не менее семи типов соматических клеток и не менее 26 морфологически различных стадий половых клеток (Hess and De Franca, 2008). В сперматогенезе выделяют три основные фазы: фаза пролиферации сперматогоний; фаза мейоза; и фаза спермиогенеза или терминальной дифференцировки.

Фаза пролиферации зависит от присутствия сперматогониальных стволовых клеток (ССК), которые происходят из гоноцитов и необходимы для поддержания пула половых клеток. Также они могут дифференцироваться в предшественников сперматогоний. Далее происходит серия клеточных делений, в ходе которых образуются сперматогонии типа А, а затем типа В – дифференцированные сперматогонии. В ходе этого процесса меняется компактизация хроматина ядра. Впоследствии сперматогонии типа В делятся на два

первичных диплоидных сперматоцита, которые вступают в мейоз (De Rooij and Griswold, 2012).

В фазе мейоза вследствие одного раунда репликации ДНК, за которым следуют два клеточных деления, плоидность уменьшается вдвое. Во время первого деления мейоза (редукционного) гомологичные хромосомы разделяются, и первичные сперматоциты дают начало гаплоидным вторичным сперматоцитам. Затем следует второе деление (эквационное), в ходе которого происходит разделение сестринских хроматид, что приводит к образованию из вторичных сперматоцитов круглых сперматид. Круглые сперматиды вступают в спермиогенез, в ходе которого они претерпевают серию морфологических и функциональных изменений, в результате чего образуются зрелые сперматозоиды (Clermont, 1972). В частности, у сперматид происходит замена большинства гистонов сначала переходными белками, а затем протаминами, что способствует значительной компактизации хроматина в ядре сперматозоидов (Gold et al., 2018; Nao et al., 2019).

В ходе мейоза происходит не только уменьшение плоидности, но и обмен генетическим материалом между гомологичными хромосомами во время профазы I. Эта стадия мейоза является наиболее изученной и наиболее продолжительной, так как основные процессы профазы I: образование синаптонемного комплекса, выравнивание и синапсис, рекомбинация – являются критически важными для корректного гаметообразования (Handel and Schimenti, 2010; Gheldof et al., 2019).

Помимо клеток зародышевой линии, в семенниках млекопитающих содержатся специализированные типы соматических клеток, которые поддерживают сперматогенез. Так, внутри семенных канальцев вместе с развивающимися половыми клетками также находятся клетки Сертоли. Эти клетки с помощью плотных межклеточных соединений образуют гемато-тестикулярный барьер, который обеспечивает изолированную среду, необходимую для развития сперматоцитов и сперматид. Помимо этого, клетки Сертоли обеспечивают паракринную поддержку для всех типов взрослых зародышевых клеток (Skinner and Grisworld, 2005). В интерстициальной ткани за пределами семенных канальцев находятся клетки Лейдига, в которых синтезируется тестостерон, необходимый для контроля сперматогенеза, а также другие соединения андрогенного ряда и небольшое количество женских половых гормонов (Zhou et al., 2019).

Процессивные волны синтеза ретиноевой кислоты (РК) непрерывно стимулируют образование сперматозоидов, вследствие чего у млекопитающих сперматогенез происходит

асинхронно и в гонаде одновременно присутствует несколько типов клеток на разных стадиях сперматогенеза (Hogarth et al., 2015).

1.3 Вступление клетки зародышевого пути в фазу мейоза

Программа вступления гамет в мейоз, как и прохождение фазы мейоза зависит от пола эмбриона. Было показано, что вступление зародышевой клеточной популяции в мейоз у мышей регулируется повышением уровня ретиноевой кислоты, инициацией экспрессии *Stra8* и поддерживается экспрессией *Stra8* от середины прелептотены до ранней лептотены (Lin et al., 2008; Endo et al., 2015). Однако пути инициации мейоза различны у самцов и самок. Так, в яичниках эмбриона ретиноевая кислота непосредственно индуцирует экспрессию *Stra8* и вступление половых клеток в мейоз. У самцов регуляция фазы начала мейоза более комплексная. В семенниках эмбриона экспрессия *Stra8* индуцируется без участия ретиноевой кислоты, так как в клетках Сертоли экспрессируется фермент, разлагающий ретиноиды, CYP26B1 (член семейства цитохрома P450) (Baltus et al., 2006; Anderson et al., 2008). Было показано, что STRA8 в качестве транскрипционного фактора связывается с помоторами многих генов, в результате чего в прелептотене активируются около 1351 генов (Kojima et al., 2019). Однако STRA8 не способен индуцировать мейоз сам по себе: так, STRA8 экспрессируется, но мейоз не начинается в ранних сперматогониях типа А (Zhou et al., 2008). В регуляции инициации мейоза с помощью ретиноевой кислоты у самцов участвует *Dazl*, который может действовать раньше *Stra8* в этом регуляторном пути (Lin et al., 2008). Таким образом, у самцов вхождение половой клетки в мейоз имеет сложную многокомпонентную регуляцию.

Прогрессия мейоза у самцов и самок имеет кардинальное различие в том, в какой период онтогенеза особи она происходит. У самок мейоз начинается в период эмбриогенеза в зародышевых клетках и останавливается на стадии диплотены (Vorum, 1961). После рождения животного мейоз возобновляется, однако снова останавливается уже на стадии метафазы II и завершается только после оплодотворения (Iwamatsu and Chang, 1972). У эмбрионов-самцов, напротив, фаза мейоза в гаметах начинается после полового созревания особи, при этом сперматогенез длится до конца жизни (Western et al., 2008).

1.4 Основные события фазы мейоза

В результате мейоза за два последовательных деления из одной диплоидной клетки образуется четыре гаплоидных. Каждое из делений, в свою очередь, состоит из четырех стадий: профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Профаза I – наиболее продолжительная фаза

мейоза, в ходе которой выделяют 5 подстадий: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез. В профазе I происходит формирование синаптонемного комплекса (СК). Это мейоз-специфичная высокомолекулярная белковая структура, обеспечивающая синапсис гомологичных хромосом. В состав СК входят два латеральных элемента, состоящие из белков SYCP2 и SYCP3, и центральный элемент, состоящий из белков SYCP1, TEX12, SYCE1, SYCE2 и SYCE3. Последовательные этапы синапсиса служат маркерами подстадий профазы I мейоза. Формирование латеральных элементов СК в ходе спаривания сестринских хроматид начинается на стадии лептотены, в зиготене происходит формирование центрального элемента СК, который соединяет гомологичные хромосомы (Zickler and Kleckner, 1999). К середине пахитены формирование СК и синапсис завершаются; в диплотене СК деполимеризуется и происходит десинапсис. Эти процессы пространственно связаны с событиями рекомбинации, которая инициируется формированием двунитевых разрывов ДНК.

На стадии лептотены происходит формирование двунитевых разрывов ДНК в так называемых горячих точках рекомбинации. Это участки ДНК протяженностью 1-2 т.п.н. с высокой частотой формирования двунитевых разрывов, окруженные районами протяженностью несколько десятков т.п.н. с пониженной частотой формирования двунитевых разрывов (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010).

Подготовка хроматина к формированию двунитевых разрывов у большинства млекопитающих начинается с того, что домен цинковых пальцев белка PRDM9 связывается с подходящим мотивом ДНК (Billings et al., 2013). С помощью домена, обеспечивающего метилтрансферазную активность, PRDM9 триметилирует гистон H3 по 4 и 36 лизину в близлежащих нуклеосомах, что приводит к реорганизации локальной структуры хроматина и создает пространство, свободное от нуклеосом (Baker et al., 2014; Powers et al., 2016). Эта свободная площадка необходима для посадки основного участника формирования двуцепочечных разрывов – эндонуклеазы SPO11. Районы хроматина, содержащие две метильные метки H3K4me3 и H3K36me3, привлекают эндонуклеазу. Эволюционно консервативный белок SPO11 «разрезает» двуцепочечную ДНК (Keeney et al., 1997), что активирует молекулярный механизм репарации двунитевых разрывов, в процессе которого киназы ATM и ATR фосфорилируют гистон H2A.X по серину 139 (γ H2A.X) (Ward and Chen, 2001). Также происходит активация нуклеазы MRE11 в составе комплекса MRN, обладающего экзо- и эндонуклеазной активностью, который создает одноцепочечные концы ДНК в месте разрыва (Borde, 2007). Однонитевые участки защищает от деградации белковый комплекс RPA.

Вместе с этим происходит выравнивание хромосом, что необходимо для репарации двунитевых разрывов ДНК по пути гомологичной рекомбинации. Формируется так называемый «хромосомный букет» – высококонсервативная структура – путем прикрепления и кластеризации теломер на ядерной оболочке (Scherthan, 2001). У млекопитающих в кластеризации теломер участвует UNC84A (SUN1). Делеция *Unc84a* приводит к нарушению формирования «букета» и гомологичного синапсиса, что, в свою очередь, приводит к стерильности у обоих полов (Ding et al., 2007).

На стадии зиготены происходит инвазия однонитевого участка ДНК в гомологичную хромосому и формирование D-петли (Рис. 1) с помощью гомологов бактериальной рекомбиназы A (*recA*) RAD51 и DMC1, которые замещают RPA и входят в состав ранних рекомбинационных узлов (Tarsounas et al., 1999). DMC1 и RAD51, которые участвуют в гомологичной рекомбинационной репарации двунитевых разрывов ДНК, составляют наиболее консервативную группу белков мейотической рекомбинации. Это связано с тем, что путь гомологичной рекомбинации помимо мейоза активно используется в митозе как один из важнейших путей восстановления повреждений ДНК у всех эукариотических организмов.

Также на этой стадии к месту репарации двунитевых разрывов приходит мейоз-специфичный белковый комплекс MSH4-MSH5 (Рис. 1), который связывает и стабилизирует промежуточное рекомбинантное соединение – двойную структуру Холлидея (Holliday, 1964) – возникающее при инвазии одноцепочечного участка ДНК (Börner et al., 2004; Snowden et al., 2004). Разрешение структур Холлидея осуществляется по кроссоверному или некроссоверному пути (Cromie and Smith, 2007).

На стадии пахитены комплекс белков мисс-матч репарации, в состав которого входят MLH1 и MLH3, завершает репарацию двунитевых разрывов ДНК по кроссоверному пути (Рис. 1) (Guillon et al., 2005). В кроссоверных сайтах происходит обмен генетической информацией между гомологичными хромосомами и формирование хиазм на стадии диплотены. Было показано, что хиазмы обеспечивают соединение и механическое натяжение гомологов в процессе мейотического деления; следовательно, для корректной сегрегации необходимо, по меньшей мере, одно кроссоверное событие на бивалент (Cole et al., 2012).

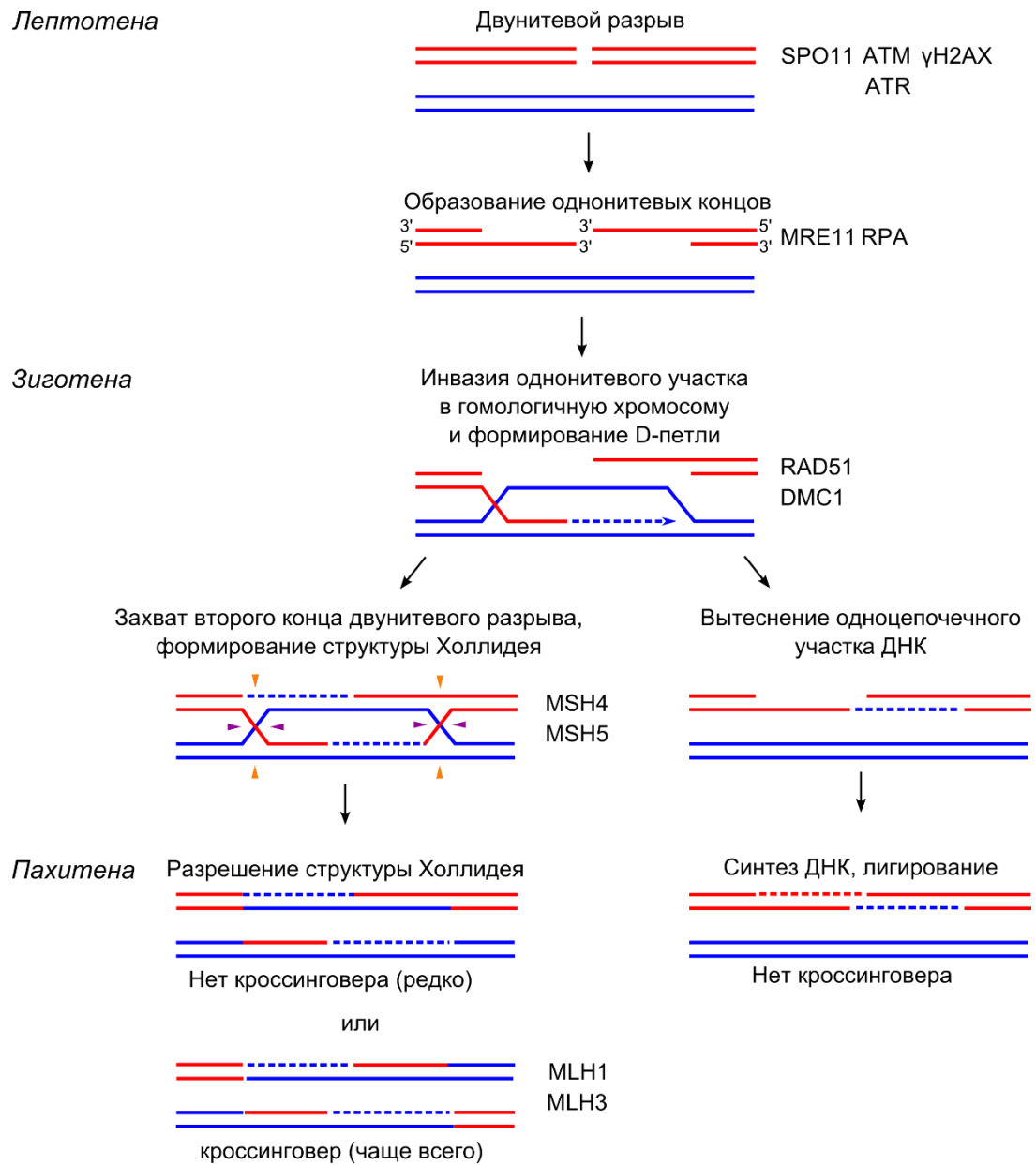


Рисунок 1. Схематическое изображение гомологичной рекомбинации (Baudat and Massy, 2007, с изменениями).

2 Роль генетических и кариотипических факторов в формировании гибридной стерильности

2.1 Роль систем контрольных точек мейоза в формировании гибридной стерильности

Нарушения рекомбинации и синапсиса могут приводить к возникновению мутаций *de novo* и формированию анеуплоидных гамет (Page and Hawley, 2003; Nagaoka et al., 2012). Для предотвращения подобных последствий существуют системы контрольных точек, которые позволяют устранять «неправильные» мейоциты. Предполагается, что существует, по крайней мере, два молекулярных механизма, которые контролируют поведение хромосомы в мейозе у различных эукариотических организмов: один путь контролирует корректность прохождения рекомбинации, а другой – завершенность синапсиса. У млекопитающих эти пути объединяет молекулярный механизм контролирующей системы «checkpoints» на стадии пахитены (Li et al., 2009). Протяженные участки асинапсиса активируют данный механизм и подвергаются транскрипционной инактивации (MSUC, meiotic silencing of unpaired chromatin) (Turner et al., 2006).

С помощью метода иммулокализации ключевых белков мейоза SYCP3, γ H2A.X, RAD51 в сперматоцитах было показано влияние мутаций на фенотип животного, которые приводят к нарушениям синапсиса и рекомбинации на стадии профазы I у мышей (Таблица 1).

Процесс фосфорилирования H2A.X проходит в две стадии. В ходе первой волны, которая проходит на стадии лептотены-зиготены, фосфорилирование распространяется на все асинаптированные участки хромосом, где расположены нерепарированные двунитевые разрывы. Двунитевые разрывы служат триггером активации PI3K-подобных киназ ATR и ATM, которые фосфорилируют гистон H2A.X по 139 серину, что приводит к активации BRCA1 (белок предрасположенности к раку молочной железы 1 типа, является частью комплекса, который участвует в репарации двунитевых разрывов ДНК), компактизации хроматина и подавлению транскрипции (Turner et al., 2004; Turner, 2007; Daniel et al., 2011; Biswas et al., 2013). Одновременно с увеличением процента синаптированных хромосом первая волна фосфорилирования идет на спад. В норме, вторая волна фосфорилирования начинается на стадии зиготены-пахитены и затрагивает только X- и Y-хромосомы (Turner, 2015).

Таблица 1. Мутантные фенотипы мыши, связанные с нарушениями синапсиса, рекомбинации и сегрегации (Handel and Schimenti, 2010).

	Лептотена	Зиготена/Пахитена	Пахитена	Пахитена/Диплотена
Мутантный фенотип	Отсутствие или снижение фосфорилирования γ H2A.X	Множественный асинапсис	Наличие асинапсиса	Ранний десинапсис Отсутствие хиазм
	Отсутствие RAD51	Большое количество сигналов RAD51 и γ H2A.X Отсутствие или нарушение формирования полового пузырька	Наличие RAD51 и γ H2A.X на аутосомах Отсутствие или нарушение формирования полового пузырька Нарушение упаковки хроматина или когезии хромосом	Наличие унивалентов в метафазе I Отставание хромосом в анафазе I
Причины	Не происходит или нарушено формирование двунитевых разрывов	Нарушена репарация двунитевых разрывов	Нарушена репарация двунитевых разрывов	Не происходит кроссинговер Нарушена когезия кинетохора
	Отсутствие рекомбинации	Нарушено формирование СК Нарушения клеточного цикла	Нарушено формирование СК Нарушения клеточного цикла Нарушена когезия Нарушена мейотическая инактивация половых хромосом	Нарушения клеточного цикла Нарушена мисс-матч репарация Незавершенная гомологичная репарация
Гены	<i>Mei1, Spo11</i>	<i>Cdk2, Dmc1, Fkbp6, Hop2, Msh4, Msh5, Piwi2, Prdm9, Rec8, Syce1, Syce2, Sycp1, Sycp2, Sycp3</i>	<i>Cpeb, H2afx, Smc1b, Tex11, Trip13</i>	<i>Ccna1, Hei10, Dmrt7, Exo1, Hspa2, Mlh1, Mlh3</i>

Мейотический сайленсинг половых хромосом (MSCI, meiotic sex chromosome silencing) является частным случаем механизма инактивации асинаптированных участков в ходе мейоза у самцов млекопитающих. Во время мейотической профазы I у самцов млекопитающих хромосомы X и Y синаптируют только в псевдоаутосомном районе (Burgoyne, 1982). В норме асинапсис большей части половых хромосом запускает механизм транскрипционного сайленсинга (Turner, 2015). Механизм сайленсинга включает в себя те

же молекулярные компоненты, что и в случае с мейотической инактивацией неспаренного хроматина: белок BRCA1, который находится в асиноптированных районах половых хромосом, привлекает киназу ATR, которая фосфорилирует H2A.X по 139 серину. Различие состоит в том, что затем асиноптированные районы подвергаются серии дополнительных гистоновых модификаций: происходит убиквитинирование гистона H2A (формируется uH2A), диметилирование гистона H3 по 9 лизину. Было показано, что поддержание и усиление сайленсинга половых хромосом не зависит от наличия двунитевых разрывов, так как все разрывы на X-хромосоме репарируются к середине пахитены (Ashley et al., 1995; Moens et al., 1997; Tarsounas et al., 1999). В результате формируется плотный гетерохроматиновый половой пузырьк на периферии клетки (Handel, 2004; Turner et al., 2006). Предполагается, что в ходе процесса мейотического сайленсинга половых хромосом подавляется транскрипция «летальных генов пахитены», расположенных на Y-хромосоме (Rojo et al., 2010; Waters and Ruiz-Herrera, 2020). Вероятно, неспособность инактивировать половые хромосомы в мейозе у самцов может приводить к активации в пахитене «летальных генов», экспрессии мобильных генетических элементов, а также к детекции нарушения системы упаковки хроматина половых хромосом еще не описанной системой клеточных сенсоров. Все это, в свою очередь, может вызвать апоптоз дефектных сперматоцитов (Turner, 2007).

В случае, когда в клетке остается значительное число нерепарированных двунитевых разрывов и обширные участки асинопсиса аутосом, они так же подвергаются фосфорилированию H2A в ходе второй волны. Предполагается, что транскрипционная инактивация генов, необходимых для прогрессии мейоза, может приводить к его остановке, что запускает процесс клеточной гибели (Turner et al., 2005). Согласно «модели голодания», мейотический сайленсинг большого числа асиноптированных участков оттягивает большое количество белков, необходимых для корректной упаковки половых хромосом, что приводит к мейотическому аресту (Turner, 2007). Обе модели включают в себя схожие молекулярные пути и могут сообща влиять на прохождение мейоза.

Ранние стадии видообразования могут сопровождаться различными нарушениями синапсиса и рекомбинации хромосом, которые влияют на степень фертильности гибридных особей. Некорректная репарация двунитевых разрывов может приводить как к подавлению рекомбинации, так и к асинопсису хромосом (Brown and O'Neill, 2010). Нарушения рекомбинации и образования хиазм могут приводить к нарушениям сегрегации, формированию несбалансированных гамет и снижению фертильности (Page and Hawley,

2003; Hassold et al., 2007). Данные нарушения могут возникать вследствие генетической дивергенции у гибридов.

2.2 Роль генетической дивергенции в формировании гибридной стерильности

Генетическая несовместимость может быть обусловлена несовместимостью аллельных вариантов одного или нескольких генов, потерей гомологии нуклеотидных последовательностей, а также «перетасовкой» генетического материала вследствие возникновения хромосомных перестроек. В настоящее время все большее внимание уделяется поиску генов, ответственных за формирование гибридной стерильности.

Геномная несовместимость у гетерозиготных гибридов возникает в результате эпистатических взаимодействий между двумя (классическая модель Добржанского-Меллера) или несколькими аллелями генов (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1937; Muller, 1942). Согласно современной версии модели Добржанского-Меллера генетическая несовместимость может формироваться в двух эволюционных сценариях. В случае «потери функции» дивергировавшие аллели становятся не способными функционально взаимодействовать. Во втором случае мутировавший аллель устанавливает новое взаимодействие с другим аллелем, ранее отсутствовавшим в родительской популяции, что приводит к состоянию «усиление функции». Если аллели участвуют в формировании репродуктивной изоляции, то их определяют, как гены гибридной стерильности.

Единичные гены гибридной стерильности были идентифицированы и охарактеризованы с точки зрения их молекулярной функции (Maheshwari and Barbash, 2011). Из выявленных к настоящему моменту генов многие предположительно участвуют в транскрипционной или трансляционной регуляции. Так, у дрожжей гены *AEP2*, *OLH1* принимают участие в регуляции трансляции (Lee et al., 2008); у дрозофилы ген *Ods* регулирует деконденсацию гетерохроматиновых районов (Bayes and Malik, 2009), а гены *Agt*, *Taf1* и *Ovd* кодируют ДНК-связывающие домены (Phadnis and Orr, 2009; Liénard et al., 2016); у мыши продукт гена *Prdm9* участвует в модификации хроматина в горячих точках рекомбинации, открывая доступ для топоизомеразы SPO11, производящей двунитевые разрывы на ранних стадиях профазы I мейоза (Mihola et al., 2009).

Для млекопитающих с PRDM9-зависимым механизмом активации рекомбинации характерна быстрая коэволюция мотивов горячих точек рекомбинации и доменов PRDM9 (Oliver et al., 2009). Механизм репарации двунитевых разрывов предполагает вырождение (эрозию) мотивов горячих точек вследствие генной конверсии, приводящей к повышенной частоте замен ГЦ. При этом уровень рекомбинации в пределах вида остается постоянным,

что получило название «парадокс горячих точек рекомбинации». Высокая скорость эволюции горячих точек рекомбинации подтверждается исследованиями рекомбинационных карт высокого разрешения человека и шимпанзе (Auton et al., 2012). Появление и исчезновение горячих точек рекомбинации обусловлено быстрой эволюцией PRDM9, что было показано на мышах (Davies et al., 2016; Smagulova et al., 2016) и человеке (Lesecque et al., 2014). Предполагается, что давление эволюционного отбора поддерживает широкую вариацию аллелей PRDM9 у многих видов. При этом специфичное для гаплотипа связывание PRDM9 направляет смещенную генную конверсию в горячих точках, что приводит к их эрозии (Baker et al., 2015). Если популяции находятся в изоляции достаточно длительное время, то дифференциальная эрозия мотивов горячих точек рекомбинации в разных линиях с разными аллелями гена *Prdm9* приведет к асимметричному распределению двунитевых разрывов по гомологичным хромосомам у гибридов. Показано, что на репарацию таких асимметричных разрывов клетке требуется больше времени, что приводит к серьезным нарушениям гомологичного синапсиса и, в конечном итоге, к стерильности гибридов (Davies et al., 2016; Smagulova et al., 2016). У людей некоторые точечные мутации в PRDM9 ассоциированы с азооспермией (Miyamoto et al., 2008; Irie et al., 2009).

Позже, однако было показано, что некоторые *Prdm9*^{-/-} мыши со смешанным генетическим фоном могут быть фертильны, что говорит о олигогенном механизме регуляции фертильности (Mihola et al., 2019). Также был опубликован случай фертильности женщины, которая являлась гомозиготой по нокаутному аллелю *Prdm9* (Narasimhan et al., 2016) и самки мыши, у которой в отсутствие работающих аллелей *Prdm9* и *Chk2* значительно снизилась степень нарушений синапсиса в ооцитах (Powers et al., 2020). При удалении *Chk2* из системы клеточного контроля, многие *Prdm9*^{-/-} ооциты избегали ареста при прохождении точки контроля целостности ДНК в мейозе и успешно завершали замедленную репарацию двунитевых разрывов, что сохраняло сниженную фертильность самок. Помимо этого, было показано, что у самок млекопитающих в отсутствие рабочего *Prdm9* включается «резервная» система формирования двунитевых разрывов. Однако «включение» такой системы зависит от генетического фона особи, что объясняет вариацию стерильных фенотипов при нарушении экспрессии *Prdm9* у гибридов разных линий мышей обоих полов (Powers et al., 2020).

Толерантность ооцитов к подавлению экспрессии *Prdm9*, по-видимому, является следствием отличия программ клеточной дифференцировки сперматогенеза и оогенеза. Для сперматоцитов обязательны два уникальных процесса: мейотическая инактивация половых хромосом (MSCI), которая приводит к сайленсингу большинства генов половых хромосом

начиная со стадии пахитены до последних стадий спермиогенеза (Turner, 2015), и активация Рiwi-взаимодействующих РНК (пиРНК). Большое число двунитевых разрывов в сперматоцитах с нарушением экспрессии *Prdm9* препятствует привлечению факторов подавления транскрипции на половые хромосомы, что нарушает MSCI и вызывает апоптоз сперматоцитов (Sun et al., 2015). У млекопитающих пиРНК необходимы для подавления экспрессии ретротранспозонов L1 в ходе сперматогенеза (Ernst et al., 2017; Czech et al., 2018). Мутации или недостаток продуктов генов, влияющих на работу пиРНК, вносят вклад в формирование стерильности у самцов (Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). Было показано, что в *Prdm9*^{-/-} сперматоцитах происходит нарушение экспрессии пиРНК (Fine et al., 2019). Возможно, нарушение регуляции пиРНК влияет на успешное прохождение постмейотических этапов развития сперматоцитов, в отличие от ооцитов.

В таксоне псовых *Prdm9* стал псевдогеном, однако это не сказалось на фертильности обоих полов (Muñoz-Fuentes et al., 2011). У видов, которые используют PRDM9-независимый механизм формирования двунитевых разрывов, разрывы формируются в таком же количестве, но они локализованы в геномных районах, обогащенных H3K4me3. Данная метильная метка характерна для функциональных элементов генома, например, промоторов (Brick et al., 2012).

Важно, что у видов с PRDM9-зависимым механизмом формирования двунитевых разрывов горячие точки рекомбинации в псевдоаутосомном районе активируются с помощью PRDM9-независимого функционального пути (Brick et al., 2012). Это доказывает одновременную активность обоих путей формирования двунитевых разрывов в клетках млекопитающих во время мейоза.

Эпистатические взаимодействия, лежащие в основе генной регуляторной сети, также могут приводить к нарушениям гаметогенеза у гибридов. Генная регуляция - это комплексный процесс, в ходе которого клетки контролируют количество продукта гена с помощью взаимодействий молекул ДНК, РНК, белков, а также эпигенетических модификаций. Считается, что для взаимодействующих регуляторных элементов характерна совместная ко-эволюция (Dover and Flavell, 1984). Нарушение взаимодействия между регуляторными элементами может приводить к нарушению работы их целевых продуктов и нижележащих звеньев по регуляторной сети взаимодействия. Одним из характерных примеров подобного типа взаимодействий является регуляция транскрипции, где происходит коэволюция нуклеотидной последовательности сайта посадки транскрипционного фактора и самого транскрипционного фактора. С помощью математического моделирования ко-эволюционного процесса было показано, что при

стабилизирующем отборе в небольших популяциях с увеличением филогенетической дистанции будет происходить более быстрое формирование гибридной стерильности, связанное с нарушениями регуляции экспрессии генов, в сравнении с положительным отбором (Mack et al., 2016).

2.3 Роль хромосомных перестроек в формировании гибридной стерильности

Изменения в геноме могут вносить как малые мутации, так и структурные варианты, затрагивающие большой участок последовательности ДНК. Точечными или малыми мутациями в нуклеотидных последовательностях считаются однонуклеотидные замены и инсерции/делеции размером менее чем 50 пар оснований. Хромосомными перестройками считаются структурные варианты, которые затрагивают участки обычно более 1 тыс. пар оснований.

Для хромосомных или геномных перестроек, попадающих под влияние отбора, характерно неравномерное распределение как в различных филогенетических линиях, так и в определенных местах генома – эволюционно ломких районах (Farré et al., 2015). Ломкие сайты, которыми обогащены эволюционно ломкие районы, были ассоциированы с эволюционно значимыми хромосомными перестройками у крупного рогатого скота, человека и других видов млекопитающих (Ruiz-Herrera et al., 2006; Mongin et al., 2009).

Одним из основных молекулярных механизмов появления эволюционно ломких районов, предположительно, является эпигенетическая модификация хроматина (Jiang et al., 2009). Особенности генома и ядерной организации в ломких районах способствуют появлению хромосомных перестроек и, таким образом, могут приводить к формированию репродуктивной изоляции (Ruiz-Herrera and Robinson, 2007). Районы, обогащенные повторенными последовательностями, например, транспозонами, генами тРНК, генами рибосом или сегментными дупликациями, более склонны к образованию перестроек и часто являются источниками инверсий (Kapun and Flatt, 2019).

Близкородственные виды млекопитающих часто различаются числом хромосом и их морфологией (Ferguson-Smith and Trifonov, 2007). Кариотипические различия возникают из-за альтернативной фиксации различных хромосомных перестроек в изолированных популяциях в процессе видообразования. Причинно-следственная связь между кариотипическими различиями и репродуктивной изоляцией остается предметом дискуссий (Faria and Navarro, 2010). Тяжесть мейотических aberrаций зависит от степени хромосомной гетерозиготности и сложности ожидаемых синаптических конфигураций. Простая гетерозиготность по единичным инверсиям или слияниям хромосом вряд ли

вызовет нарушение мейоза и стерильность. Даже множественная простая гетерозиготность, когда в одном кариотипе присутствует несколько гетероморфных бивалентов и/или тривалентов, обычно не приводит к нарушению хромосомного синапсиса и сегрегации. Так, был описан случай, когда у землеройки серия полноплечевых Робертсоновских транслокаций не приводила к снижению фертильности у гибридов между разными хромосомными расами, несмотря на формирование мультивалента из 11 хромосомных элементов (Matveevsky et al., 2023). Напротив, сложные гетерозиготы (гетерозиготы по нескольким типам перестроек, множественным слияниям и/или нескольким инверсиям, которые могут наслаиваться в том числе внутри одной и той же хромосомы) часто обнаруживают серьезные мейотические аномалии (Mercer et al., 1992; King, 1993; Rumpfer, 1993; Wallace et al., 2002; Faria and Navarro, 2010; Basheva et al., 2014b; Borodin et al., 2019).

В настоящее время существуют две основные модели, которые объясняют, как хромосомные перестройки могут обеспечивать генетическое разнообразие и, следовательно, способствовать видообразованию (Ayala and Coluzzi, 2005). Модель гибридной дисфункции предполагает, что особи, гетерозиготные по хромосомным перестройкам, частично или полностью стерильны. Причиной этого становятся изменения кариотипа (числа и морфологии хромосом), которые могут вызывать нарушения синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе (White, 1978; Brown and O'Neill, 2010). Основным недостатком этой модели была крайне низкая вероятность того, что перестройки с сильным негативным влиянием на приспособленность будут подвергаться действию положительного отбора и фиксироваться в популяции (Hedrick, 1981; Rieseberg, 2001).

Согласно современной модели супрессии рекомбинации, рекомбинация может быть снижена или подавлена в районах точек разрыва хромосомных перестроек, что уменьшает поток генов между популяциями и приводит к возникновению неполной репродуктивной изоляции (Noor et al., 2001; Rieseberg, 2001). Усиление генетической дивергенции в перестроенных хромосомах приводит к накоплению генов гибридной стерильности или новых аллелей генов, что может приводить к дивергенции исходных популяций и их адаптации к различным экосистемам (Ayala and Coluzzi, 2005). Ярким примером служит перестройка *rob(2; 28)*, возникшая у гайала (*Bos frontalis*). Было показано, что робертсоновская транслокация повлияла на изменение экспрессии генов, связанных с составом миофибрилл, что, вероятно, ускорило адаптацию саркомеров гайала к горной среде обитания (Anderson and Weir, 2022).

Существуют несколько основных типов хромосомных перестроек, которые могут приводить к нарушению синапсиса и рекомбинации у гибридных особей.

Тандемные слияния – слияния типа центромера-теломера или теломера-теломера – хромосомные перестройки, влияние которых на фертильность гетерозигот считается одним из наиболее значимых. У гетерозиготных особей число сбалансированных гамет может снижаться вдвое (King, 1993), вследствие чего тандемные слияния в гетерозиготном состоянии были обнаружены всего у нескольких видов, в том числе у летучей мыши (Owen and Baker, 2001), мышовки (Kovalskaya et al., 2011) и туко-туко (Massarini et al., 2002).

Инверсии – это сбалансированные хромосомные перестройки, возникающие вследствие поворота участка хромосомы на 180° . Принято считать, что влияние инверсий на приспособленность особи невелико и вероятность их фиксации мала (Rieseberg, 2001). Считается, что в инвертированных районах у гетерозигот может происходить подавление рекомбинации. Как следствие, поток генов между популяциями снижается (Noor et al., 2001), что может приводить к постепенному формированию репродуктивной изоляции (Kirkpatrick and Barton, 2006). Различают парацентрические, в которых инвертированный участок не включает центромеру, и перичентрические инверсии, в инвертированный участок которых попадает центромера. Для некоторых парацентрических инверсий у человека была показана достоверная связь с возникновением таких заболеваний как астма и ожирение, что, однако, напрямую не влияло на фертильность носителей (González et al., 2014). Стабильный полиморфизм по перичентрическим инверсиям широко распространен среди различных отрядов млекопитающих (Van Tuinen et al., 1999; Kovalskaya et al., 2011). Гетерозиготность по нескольким инверсиям может приводить к серьезным нарушениям синапсиса и рекомбинации. Это, в свою очередь, вызывает нарушение прохождения точки контроля пахитены, гибель гамет и, как следствие, – гибридную стерильность.

На примере двух видов плодовой мушки, *D. montana* и *D. flavomontana*, было показано, что предковые полиморфные инверсии могут выступать в качестве драйвера видообразования. Оценка генетической дивергенции показала, что часть инверсий, по которым различались кариотипы исследуемых видов, возникли раньше времени расхождения видов. Вероятно, это было связано с разными условиями среды обитания и экологической изоляцией исходных популяций на фоне частичной симпатрии (Poikela et al., 2022). Эволюция инверсий связана с давлением отбора и зависит от генетического дрейфа, появления новых мутаций, существования потока генов, а также от взаимодействия с другими инверсиями (Faria et al., 2019).

Реципрокные и нереципрокные транслокации – тип хромосомных перестроек, при которых происходит обмен хромосомных сегментов или хромосомных плеч между негомологичными хромосомами. У гетерозигот по одному Робертсоновскому слиянию

уровень рекомбинации не снижается по всей длине хромосом, за исключением прицентромерных районов, что обычно не приводит к стерильности гибридов (Basset et al., 2006; Borodin et al., 2008). У гетерозигот по нескольким робертсоновским слияниям (частный случай – монобрахиальная гомология) нарушения синапсиса и рекомбинации гомологичных хромосом могут приводить к значительному снижению фертильности. Это было отмечено у нигерийской песчанки (Hima et al., 2011), землеройки (Rogatcheva et al., 1998), домашней мыши (Sans-Fuentes et al., 2010). У лемуру, гетерозиготных по робертсоновским слияниям, наблюдалась прямая зависимость между степенью сложности конфигураций мультивалентов, образующихся на стадии пахитены, и степенью фертильности (Rumpler and Dutrillaux, 1976; King, 1993).

В некоторых случаях гетерозиготность по нескольким робертсоновским транслокациям не приводит к гибридной стерильности. У обыкновенной бурозубки и туко-туко были описаны гибриды между хромосомными расами, которые различаются несколькими робертсоновскими транслокациями (Basheva et al., 2014b; Belonogova et al., 2017). Несмотря на формирование комплексных мультивалентов, в этих случаях не происходило снижения фертильности гибридов и ограничения потока генов между хромосомными расами (Basset et al., 2006).

Сравнительные исследования последовательности ДНК и хромосомной синтении показали, что местоположение центромер может различаться у двух гомологичных хромосом без изменения порядка ДНК-маркеров. У млекопитающих было описано несколько случаев центромерных сдвигов (centromere shifts) в разных таксонах (Marshall et al., 2008). Влияние гетерозиготности по центромерным сдвигам изучено крайне мало. Так, в ходе быстрого видообразования в семействе Лошадиных помимо прочих хромосомных перестроек наблюдалась высокая частота изменений местоположений центромеры (Carbone et al., 2006). В результате такой быстрой кариотипической эволюции гибридизация между видами остается возможной, однако полученные гибриды, хотя и жизнеспособны, почти всегда стерильны (Zong and Fan, 1989; Allen and Short, 1997). Так как родительские наборы хромосом оказываются несовместимы, у самцов гибридов сперматогенез останавливается на стадии ранней пахитены (Chandley et al., 1974), однако отделить влияние одного типа перестроек от другого, а также от генетической дивергенции в данной модели не представляется возможным.

Реорганизация генетического аппарата, которая происходит при хромосомных перестройках, крайне важна на ранних этапах видообразования. Хромосомные перестройки изменяют структуру и пространственное положение групп сцепления, что влияет на

транскрипционную активность генов и рекомбинацию. Таким образом, перестройки хромосом не только влияют на геномный ландшафт, но также обеспечивают механизмы для ограничения потока генов.

2.4 Роль половых хромосом в формировании гибридной стерильности

Было показано, что у млекопитающих формирование гибридной стерильности происходит не только у видов с перестроенными кариотипами, но и у кариотипически идентичных видов. Однако оба случая объединяет подчинение правилу Холдейна (1922), согласно которому у гетерозигот менее жизнеспособным или стерильным будет гетерогаметный пол. При объяснении правила Холдейна рассматривают несколько основополагающих причин, в том числе рецессивность генов гибридной несовместимости и более быстрое накопление подобных генов в X-хромосоме (Wu and Davis, 1993; Masly and Presgraves, 2007).

Современная теория «перемещения генов» связывает правило Холдейна и сильное влияние X-хромосомы (the Large X-effect) на проявление межвидовой гибридной несовместимости. Согласно данной теории, гены могут менять свое местоположение на хромосоме простым перемещением типа делеция-инсерция и с помощью дупликаций. Так, если в одной из дочерних популяций произошла дупликация гена (например, с X-хромосомы на аутосому), то впоследствии происходит потеря гена из первоначального локуса. При последующей встрече популяций, в которых один и тот же ген будет расположен на разных хромосомах, в гаметах может не оказаться ни одной копии гена. В результате произойдет инактивация X-хромосомы, что приведет к нарушению дозы гена у потомков или нарушению экспрессии генов X-хромосомы. Таким образом, перемещение генов может приводить к возникновению гибридной стерильности и способствовать видообразованию (Coyne and Orr, 2004; Moyle et al., 2010).

Одним из примеров сильного влияния X-хромосомы является асимметрия скрещиваний во многих случаях гибридной стерильности у самцов. Асимметрия проявляется в том, что различные фенотипы гибридов прямого и обратного скрещиваний различаются по степени проявления в зависимости от унаследованной материнской X-хромосомы и X-сцепленных локусов (Good et al., 2007; White et al., 2011). Недавние исследования показали, что локус *Hstx2* на X-хромосоме домашней мыши контролирует асимметричное нарушение сперматогенеза у реципрокных межвидовых гибридов F1 (Bhattacharyya et al., 2014). Так, у стерильных самцов гибридов подвидов домашней мыши *M. m. domesticus* × *M. m. molossinus* (линий BALB/cJ и JF1mol, соответственно) сперматогенез

останавливался на стадии метафазы I вследствие нарушения синапсиса гомологичных хромосом. При скрещивании самок других линий *M. m. domesticus* с самцами *M. m. molossinus* F1 самцы были фертильны. Степень фертильности гибридов зависела от унаследованной X-хромосомы, а именно от аллель-специфичной экспрессии мейотических генов, расположенных на X-хромосоме рядом с псевдоаутосомным районом. Таким образом, причиной остановки сперматогенеза являлась генетическая несовместимость (Nishino et al., 2018).

2.5 Роль нарушений синапсиса и рекомбинации в псевдоаутосомном районе (ПАР) в формировании гибридной стерильности

Псевдоаутосомный район (ПАР) - это район, в котором сохраняется гомология нуклеотидных последовательностей, участвующих в синапсисе, рекомбинации и сегрегации гетероморфных половых хромосом в мейозе (Burgoyne, 1982). Известными в настоящее время исключениями являются некоторые виды полевок рода *Microtus*, у которых половые хромосомы не рекомбинируют и не синаптируют в мейозе (Vorodin et al., 2012).

Расположенные в ПАР локусы диплоидны (Ross et al., 2005; Flaquer et al., 2008) и не подвергаются дозовой компенсации с помощью инактивации X-хромосомы у самок (Prothero et al., 2009). Физически псевдоаутосомный район обычно расположен между теломерным концом половых хромосом и буферным районом, в котором могут происходить инверсии, транспозиции, располагаться SINE-элементы. В буферном районе наблюдается постепенное уменьшение гомологии нуклеотидных последовательностей между X и Y, отсутствие рекомбинации. Далее по хромосоме расположены специфические для половых хромосом последовательности (Ross et al., 2005).

Предполагается, что рекомбинация в псевдоаутосомном районе необходима для поддержания гомологии между половыми хромосомами, а также обеспечивает правильность синапсиса и сегрегации половых хромосом во время мейоза (Otto et al., 2011). Это согласуется с исследованиями на человеке и мышах, в которых показано, что подавление рекомбинации в ПАР связано с повышенной частотой анеуплоидии XY и стерильностью (Kauppi et al., 2012).

Несмотря на, как правило, небольшой размер ПАР у самцов всегда содержит один облигатный обмен. Вероятно, он обеспечивается более высокой по сравнению с аутосомами частотой двунитевых разрывов ДНК на этом участке (Sorgiano et al., 1987). Это может быть связано с особенностями структуры хроматина этого геномного района. ДНК в

псевдоаутосомном районе упакована в петли меньшего размера по сравнению с аутосомами, что увеличивает частоту формирования двунитевых разрывов в этом районе (Kauppi et al., 2012). Помимо этого, присутствие одного обязательного обмена в ПАР можно объяснить наличием конститутивно доступного хроматина. Как следствие, инициация гомологичной рекомбинации может происходить без участия белка PRDM9, в отличие от остальной части генома, для которой доступен только PRDM9-зависимый путь рекомбинации (Brick et al., 2012). Было высказано предположение, что в PRDM9-зависимых и PRDM9-независимых рекомбинационных путях задействованы альтернативные изоформы белка SPO11 (Kauppi et al., 2011).

У млекопитающих нуклеотидная последовательность ПАР претерпевает быстрые изменения (Ellison et al., 1996). Потеря гомологии нуклеотидных последовательностей этого района между половыми хромосомами может приводить к асинапсису полового бивалента у самцов, что может быть причиной гибридной стерильности. Было показано, что высокая частота асинапсиса половых хромосом наблюдалась у стерильных самцов межвидовых гибридов мохноногих хомячков (Ishishita et al., 2015), межвидовых и внутривидовых гибридов домового мыши (Matsuda et al., 1991, 1992; Bhattacharyya et al., 2013). Однако Уайт с коллегами (2012) показали, что, несмотря на нарушения синапсиса и рекомбинации полового бивалента, у гибридов двух подвидов домового мыши сохраняется фертильность.

Асинапсис половых хромосом вызывает распространение транскрипционной инактивации на псевдоаутосомный район. Последствия этой инактивации могут зависеть от того, играют ли гены, содержащиеся в ПАР, важную роль в сперматогенезе. Однако для большинства видов количество и функция генов в ПАР остаются неизученными (Raudsepp and Chowdhary, 2016). Помимо этого, нарушение мейотического сайленсинга половых хромосом может спровоцировать апоптоз дефектных сперматоцитов (Turner et al., 2005).

Таким образом, быстрая дивергенция нуклеотидных последовательностей ПАР может быть одним из молекулярных механизмов формирования гибридной стерильности.

3 Обоснование модели и методов

Внутривидовые и межвидовые гибриды между родительскими формами, кариотипы которых полностью идентичны или различаются по числу и типу хромосомных перестроек, являются хорошей моделью для изучения нарушений синапсиса и рекомбинации на ранних стадиях мейоза и аббераций сперматогенеза. Использование гибридов родительских форм различной степени дивергенции удобно для изучения последовательных этапов

формирования гибридной стерильности. Преимущество межвидовых гибридов перед нокаутными организмами в том, что мы исследуем последствия системных генетических несовместимостей и можем видеть вариации фенотипов, связанных с комплексной регуляцией генов гибридной стерильности. Использование видов с малыми эволюционными расстояниями позволяет изучать постепенные этапы формирования гибридной стерильности, которые удобно оценивать по нарушениям сперматогенеза в целом и мейоза в частности. Предпочтение отдано сперматогенезу, так как самцы по многим критериям более удобный объект по сравнению с самками. Так, для самцов характерен длительный период половой зрелости, в который определенный пул клеток будет постоянно проходить мейоз, тогда как у самок Хомяковых клетки на стадии профазы I мейоза можно извлечь только у новорожденных особей.

Анализ последовательных этапов кариотипической эволюции от индивидуальной изменчивости к дивергенции между популяциями, хромосомными расами и, наконец, видами особенно важен для понимания роли хромосомных перестроек в видообразовании. Поэтому в качестве первой модели для изучения формирования гибридной стерильности мы выбрали гибридов между хромосомными расами вида *A. evoronensis* и межвидовых гибридов полевок рода *Alexandromys* (Рис. 2), ранее входившего в род *Microtus*: полевка Максимовича *A. maximowiczii* Ognev, 1914 (MAX), муйская полевка *A. mujanensis* Orlov and Kovalskaja, 1978 (MUJ) и эворонская полевка *A. evoronensis* Kovalskaya and Sokolov, 1980. Все они демонстрируют исключительно высокий уровень хромосомного полиморфизма, популяционный политипизм и развитую кариотипическую дивергенцию.

Время дивергенции между этими тремя видами оценивается примерно в 110 тыс. лет (Bannikova et al., 2010, 2019). В настоящее время полностью не определены границы систематического положения этих видов (Lissoovsky et al., 2018), однако известно, что межвидовые гибриды прямого и обратного направления скрещиваний обоих полов стерильны (Meyer, 1994; Meyer et al., 1996).

Все три вида населяют влажные биотопы: болота и заболоченные участки по берегам озер и рек. Полевка Максимовича (MAX) имеет широкий, но мозаичный ареал обитания от восточного берега Байкала до западного склона Сихотэ-Алиня (Batsaikhan and Tsytsulina, 2016). Этот вид демонстрирует как внутри-, так и межпопуляционный полиморфизм по ряду центромерных сдвигов, инверсий, слияний и полноплечевых транслокаций. Диплоидное число хромосом MAX ($2n$) варьирует от 36 до 44. Число хромосомных плеч (FN) варьирует от 52 до 62 (Kartavtseva et al., 2008; Lemskaya et al., 2010).

Муйская полевка (MUJ) — эндемик северных районов Бурятии и северо-запада Забайкальского края (Gerrie and Kennerley, 2016b). Для данного вида характерен полиморфизм по периферическим инверсиям или центромерным сдвигам в четырех парах хромосом ($2n = 38$; FN = 50-53) (Orlov and Kovalskaya, 1978; Meyer et al., 1996; Borodin et al., 2010; Lemskaya et al., 2015; Kartavtseva et al., 2019).

Эворонская полевка обнаружена в нескольких разрозненных местообитаниях Хабаровского края (Gerrie and Kennerley, 2016a). Исследователи выделяют две хромосомные расы: «Эворон» (EVE) ($2n=38-41$, FN=54-59), населяющую Эворон-Чукчагирскую низменность, и «Арги» (EVA) ($2n=34, 36, 37$, FN=51-56), которая распространена по р. Арги, притоку р. Зея (Kartavtseva et al., 2021b, 2021a). Время формирования данных хромосомных рас оценивается в 8-10 тысяч лет назад, так как в это время в период последнего похолодания в начале голоцена происходила реорганизация озерно-речных систем Дальнего Востока (Шереметьева et al., 2017) или примерно в 20 тысяч лет назад согласно молекулярным данным анализа последовательностей *cytb* (Bannikova et al., 2010). Всего для эворонской полевки было описано 11 пар хромосом, вовлеченных в хромосомные перестройки.

В качестве второй модели с большим временем дивергенции между родительскими видами и меньшим количеством перестроек между их кариотипами мы выбрали межвидовых гибридов между близкородственными видами европейской линии рода *Microtus* *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. mystacinus*, *M. arvalis* «obscurus» и *M. transcaspicus* (Рис. 2). Время дивергенции родительских видов полевок подрода *Microtus* составляет около 60-250 тысяч лет (Mahmoudi et al., 2017; Golenishchev et al., 2019). Кариотипы *M. mystacinus* и *M. kermanensis* практически неотличимы друг от друга по паттерну С-окрашивания и распределению ядрышкового организатора (ЯОР) и отличаются от кариотипа *M. rossiaemeridionalis* только по паттерну С-окрашивания (Mahmoudi et al., 2018). Было показано, что самки гибридов между *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* фертильны (Golenishchev et al., 2000). Известно, что гибриды обоих полов между группой видов «*mystacinus*» с одной стороны и *M. arvalis* и *M. transcaspicus*, с другой стороны, стерильны (Meyer et al., 1996).

Так как морфологически и кариотипически эти виды часто сложно различить, то история их наименований запутана. Так, *M. rossiaemeridionalis* в настоящее время используют как синоним *M. levis* (Mahmoudi et al., 2017), *M. transcaspicus* какое-то время был синонимом для *M. kermanensis*, а *M. mystacinus* – для *M. arvalis* (Musser and Carleton, 2005). Сложность точного определения видов и их неясный таксономический статус

объясняется сходными ареалами обитания: *M. transcaspicus*, *M. kermanensis* и *M. mystacinus* – эндемики с близкими, но неперекрывающимися ареалами обитания. *M. kermanensis* населяет высокогорные луга плато Сардуйе в горном Кермане (южный Иран), *M. mystacinus* – горы на севере Ирана, в том числе горы Зенджан, горы Голестан, Эльбурс, а также Семнан, Тегеран и долину реки Лар, ареал *M. transcaspicus* ограничен иранской и туркменской горной системой Копетдаг и территорией центрального Афганистана (Mahmoudi et al., 2017). Ареалы обитания *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* широки, перекрываются и оба захватывают предгорья Карпат (Raicu et al., 1969).

В качестве третьей модели для изучения формирования гибридной стерильности на ранних этапах видообразования без накопления хромосомных перестроек, но с относительно большим временем дивергенции мы использовали самцов и самок гибридов двух близкородственных видов мохноногих хомячков, *P. sungorus* и *P. campbelli* (Рис. 2). Данные виды дивергировали 0.8-1 млн лет назад (Neumann et al., 2006) и их кариотипы практически идентичны ($2n=28$, $NF=54$) (Romanenko et al., 2007). Не смотря на отсутствие кариотипической дивергенции и относительно малое время дивергенции между видами, гибриды демонстрируют пониженную приспособленность, при этом была показана асимметрия прямого и обратного скрещиваний. Так, для гибридов, полученных в результате скрещивания самок *P. sungorus* с самцами *P. campbelli*, характерен экстенсивный плацентарный и эмбриональный рост, что приводит к высоким показателям эмбриональной и материнской смертности. При скрещивании самок *P. campbelli* с самцами *P. sungorus* у потомства наблюдается нормальный размер тела (Brekke et al., 2016). Известно, что гибридные самцы стерильны, а самки фертильны (Ishishita et al., 2015).

P. sungorus населяет Казахстан и северо-западную часть Китая, тогда как *P. campbelli* обитает в степных и полупустынных районах центральной и северной Азии, включая Монголию, Туву, северо-восток Китая и Алтайские горы. Ареалы обитания *P. sungorus* и *P. campbelli* географически разделены, поэтому гибриды могут быть получены только в лабораторных условиях (Neumann et al., 2006).

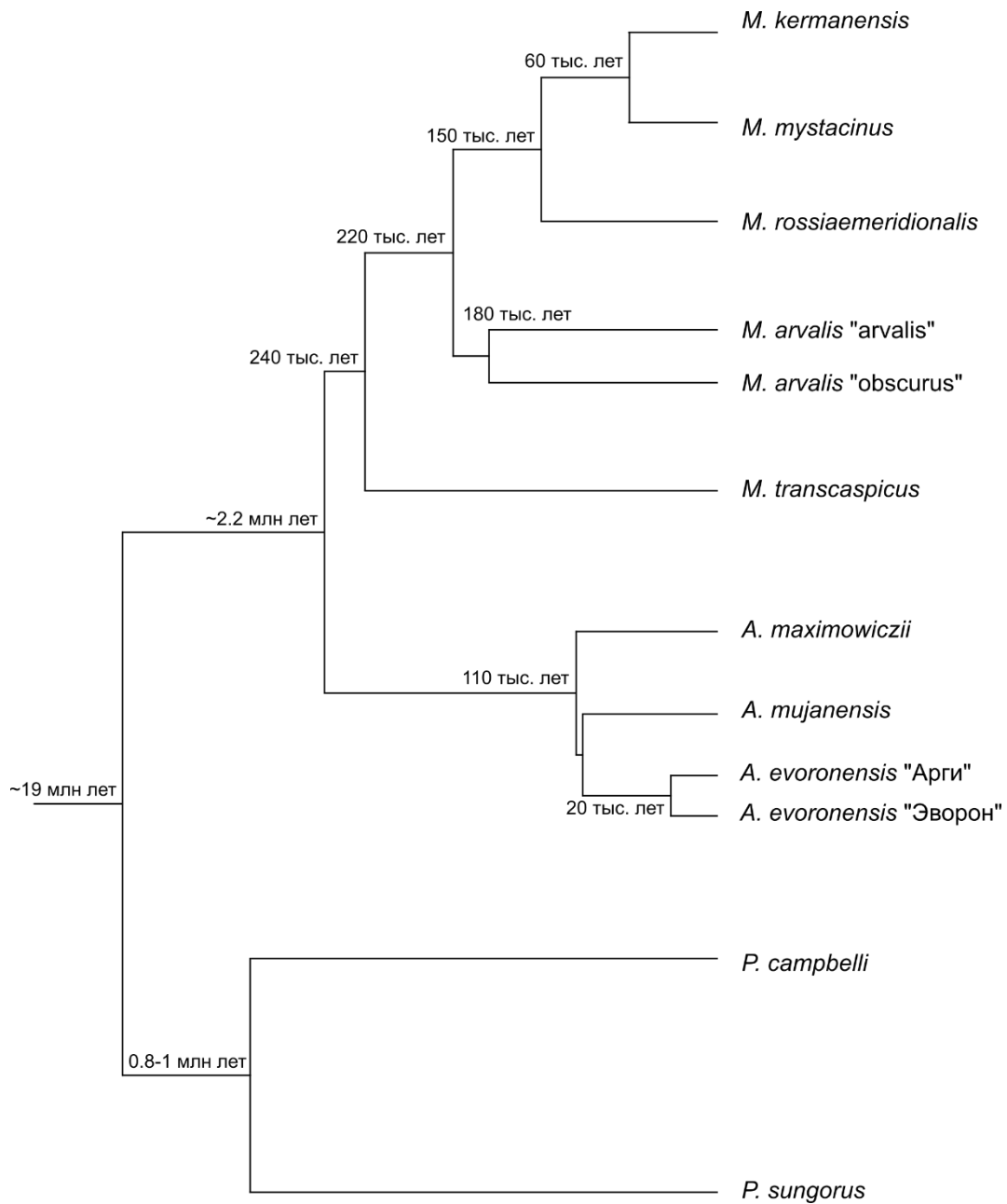


Рисунок 2. Консенсусная кладограмма группы видов «maximowiczii» рода *Alexandromys*, группы видов «arvalis» рода *Microtus* и некоторых видов рода *Phodopus* (Neumann et al., 2006; Abramson et al., 2009; Bannikova et al., 2010, 2019; Mahmoudi et al., 2017; Golenishchev et al., 2019).

Для сравнительного анализа рекомбинационных характеристик мы использовали метод иммунолокализации нескольких белков, специфически экспрессируемых на разных подстадиях профазы I мейоза (Anderson et al., 1999). SYCP3 и SYCP1 маркируют боковой и центральный элементы СК, соответственно (Zickler and Kleckner, 2015), γ H2AX вовлечен в репарацию двунитевых разрывов ДНК и мейотическую инактивацию неспаренного хроматина, в том числе мейотическую инактивацию половых хромосом (Turner, 2015). Частоту и распределение рекомбинационных событий оценивали с помощью MLH1. Было показано, что белок мисс-матч репарации MLH1 входит в состав зрелых рекомбинационных узелков на стадии пахитены. Андерсон с сотрудниками (Anderson et al., 1999) продемонстрировали, что число и распределение сайтов MLH1 вдоль СК соответствует числу и распределению хиазм, полученному ранее для мыши (Polani, 1972; Lawrie et al., 1995). Таким образом, белок мисс-матч репарации MLH1 является надежным маркером рекомбинационных событий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В работе были использованы взрослые половозрелые самцы и новорожденные самки (Таблица 2). Полевки родительских видов были пойманы в дикой природе и содержались в виварии БПИ ДВО РАН и в виварии Зоологического института РАН, там же были получены и содержались гибриды полевок. Было проанализировано 29 самцов полевок рода *Alexandromys*, 52 самца полевок рода *Microtus*, 18 самцов и 10 самок хомячков рода *Phodopus*. Содержание и эвтаназия животных проводились в соответствии с протоколами, одобренными Комиссией по биоэтике ФИЦ ИЦиГ СО РАН (протокол N35 от 26 октября 2016; протокол N132 от 19 октября 2022), Комитетом по регулированию экспериментальных исследований ФИЦ Биолого-почвенного института ДВО РАН (протокол N1 от 25 апреля 2022) и Комиссией по биоэтике Зоологического института РАН.

Получение окрашенных парафиновых срезов и гистологический анализ

Сразу после эвтаназии выделяли семенники взрослых самцов. Ткани семенника фиксировали в 10% забуференном формалине (HistoSafe®, BioVitrum, Россия) в течение не менее 48 часов. Образцы были обезвожены в серии градиента этанола (BioVitrum), погружены в ксилол (BioVitrum) и залиты парафином (BioVitrum). Затем с помощью микротомы проводилась серия срезов толщиной 5 мкм. Срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином (BioVitrum) и водно-спиртовым раствором эозина с концентрацией спирта 25% и эозина 15% (BioVitrum), монтировали с помощью Витрогеля (BioVitrum) и анализировали с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенного камерой CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss) и пакетом обработки изображений AxioVision (Carl Zeiss).

Цикл сперматогенного эпителия на поперечных срезах семенников был определен согласно соответствующим описаниям на мышах (Russell et al., 1993; Ahmed and de Rooij, 2009). Согласно Расселу и соавт. (1993) стадии VI-VIII цикла сперматогенного эпителия у классических модельных видов (мышь и крыса) имеют одинаковый паттерн клеточных стадий: удлиненные сперматиды, круглые сперматиды, пахитенные сперматоциты и сперматогонии. Галлени и соавт. (1998) показал, что общая морфология гонад *Microtus savii* и *M. brachycercus* была схожей с таковой у мышей и крыс. Таким образом, ограничение морфометрии канальцев только стадиями VI-VIII позволяет свести к минимуму таксон-специфическую изменчивость. Различные стадии профазы I (лептотену, зиготену, пахитену и диплотену) определяли по состоянию хроматина в ядрах и с учетом стадии канальца.

Таблица 2. Представители семейства Хомяковые и их внутри- и межвидовые гибриды, вошедшие в работу. В скрещиваниях на первом месте стоит самка, на втором самец. Разные популяции обозначены цифрой (например, EVA-2).

Вид/Скрещивание	Аббревиатура	Пол	Число животных
Родительские виды			
<i>A. maximowiczii</i>	MAX	♂	4
<i>A. mujanensis</i>	MUJ	♂	3
<i>A. evoronensis</i> «Арги»	EVA	♂	4
<i>A. evoronensis</i> «Эворон»	EVE	♂	2
<i>M. kermanensis</i>	KER	♂	1
<i>M. rossiaemeridionalis</i>	ROS	♂	7
<i>M. mystacinus</i>	MYS	♂	7
<i>M. arvalis</i> «obscurus»	ARV	♂	1
<i>M. transcaspicus</i>	TRA	♂	1
<i>P. sungorus</i>	PSU	♂	5
<i>P. sungorus</i>	PSU	♀	3
<i>P. campbelli</i>	PCA	♂	5
<i>P. campbelli</i>	PCA	♀	3
Межпопуляционные гибриды и гибриды между хромосомными расами			
<i>A. evoronensis</i> «Арги»-2 x <i>A. evoronensis</i> «Арги»-1	EVA-2 x EVA-1	♂	2
<i>A. evoronensis</i> «Арги»-2 x <i>A. evoronensis</i> «Эворон»	EVA-2 x EVE	♂	3
Межвидовые гибриды			
<i>A. mujanensis</i> x <i>A. maximowiczii</i>	MUJ x MAX	♂	1
<i>A. evoronensis</i> «Арги» x <i>A. mujanensis</i>	EVA x MUJ	♂	2
<i>A. mujanensis</i> x <i>A. evoronensis</i> «Арги»	MUJ x EVA	♂	1
<i>A. maximowiczii</i> x <i>A. evoronensis</i> «Эворон»	MAX x EVE	♂	3
<i>A. evoronensis</i> «Арги» x <i>A. maximowiczii</i>	EVA x MAX	♂	4
<i>M. kermanensis</i> x <i>M. rossiaemeridionalis</i>	KER x ROS	♂	3
<i>M. rossiaemeridionalis</i> x <i>M. kermanensis</i>	ROS x KER	♂	4
<i>M. kermanensis</i> x <i>M. mystacinus</i>	KER x MYS	♂	4
<i>M. mystacinus</i> x <i>M. kermanensis</i>	MYS x KER	♂	2
<i>M. mystacinus</i> x <i>M. rossiaemeridionalis</i>	MYS x ROS	♂	8
<i>M. rossiaemeridionalis</i> x <i>M. mystacinus</i>	ROS x MYS	♂	8
<i>M. arvalis</i> «obscurus» x <i>M. kermanensis</i>	ARV x KER	♂	3
<i>M. kermanensis</i> x <i>M. transcaspicus</i>	KER x TRA	♂	2
<i>P. campbelli</i> x <i>P. sungorus</i>	PCA x PSU	♂	8
<i>P. campbelli</i> x <i>P. sungorus</i>	PCA x PSU	♀	4

Соотношение сперматид и сперматоцитов I оценивали в случайно выбранных канальцах на стадиях VI-VIII. Значительное отклонение наблюдаемого соотношения от ожидаемого 4:1 считалось показателем нарушения сперматогенеза.

Детекция апоптотических клеток с использованием метода TUNEL

Срезы каждого образца депарафинизировали, промывали в фосфатно-солевом буфере с последующей фиксацией в 4% параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере (pH 8). Фрагментированную ДНК клеток, погибших путем апоптоза, детектировали с помощью опосредованного терминальной дезоксиуридинтрифосфатной трансферазой (TUNEL) с использованием набора реактивов DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, США). Стекла со срезами покрывали раствором с реагентом, снижающим интенсивность выгорания препарата (Vectashield, Vector Laboratories или Vectashield with DAPI, Vector Laboratories) и анализировали под микроскопом Axioscop 2 plus (Carl Zeiss), как описано выше.

Приготовление препаратов распластанных хромосом. Иммуноокрашивание

Препараты распластанных хромосом СК из сперматоцитов половозрелых самцов и ооцитов новорожденных самок были приготовлены согласно одной из стандартных методик (Peters et al., 1997). Извлеченные гонады промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), удаляли внешнюю оболочку и помещали в гипотонический буфер (pH 8.2, 17 мМ цитрат дигидрат натрия, 30 мМ Tris, 50 мМ сахарозы, 5 мМ ЭДТА) на 60 мин при комнатной температуре. После этого части семенных канальцев длиной 5 мм или целые яичники измельчали в 40 мкл сахарозы (pH 8.2, 0.1 М) до состояния суспензии, которую наносили на предварительно смоченные фиксатором (1% р-р параформальдегида, pH 9.2) предметные стекла, покрытые полилизинном. Препараты оставляли на 2 часа во влажной камере при комнатной температуре, промывали 2 раза по 2 мин в 4% растворе Fotoflo (pH 8.4, Kodak) и оставляли до полного высыхания. Готовые препараты хранили при температуре -20°C.

Иммуноокрашивание проводилось согласно стандартному протоколу (Anderson et al., 1999). Для блокирования неспецифического связывания антител использовали 0.1х РВТ, для разведения антител – 1х РВТ, (3% BSA (Sigma), 0.05% Tween 20 (Sigma) в 1хPBS). Длительность блокирования антител составляла 45 мин при комнатной температуре. Длительность инкубации препаратов с первичными антителами составляла 5-12 часов при 37°C, вторичными антителами – 1 час во влажной камере при 37°C. После иммуноокрашивания препараты покрывали раствором с реагентом, снижающим интенсивность выгорания препарата (Vectashield, Vector Laboratories или Vectashield with DAPI, Vector Laboratories).

Первичные антитела, использованные в работе: кроличьи поликлональные к белку латерального элемента СК SYCP3 (1:500; Abcam), мышинные моноклональные к белку

латерального элемента СК SYCP3 (1:100; Abcam), мышинные моноклональные к белку MLH1 (1:30; Abcam), кроличьи поликлональные к белку γ H2A.X (1:330; Abcam), кроличьи поликлональные к белку центрального элемента СК SYCP1 (1:500; Abcam) и антитела человека к центромерным белкам (1:70; Antibodies Inc.). Вторичные антитела, использованные в работе: антитела козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch), антитела козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с FITC (1:30 Jackson ImmunoResearch), антитела осла к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с AMCA (1:40; Invitrogen). Антитела сочетали в различных комбинациях в зависимости от поставленных задач.

Препараты анализировали на микроскопе AxioPlan 2 (Carl Zeiss), оборудованном CCD-камерой (CV M300, JAI, Япония), набором фильтров CHROMA и пакетом обработки изображений ISIS4 (MetaSystem GmbH, Германия). Полученные на эпифлуоресцентном микроскопе изображения обрабатывали с помощью графического редактора Corel PaintShop Pro X6.

Мы идентифицировали подстадии профазы I мейоза с помощью иммулокализации SYCP3, γ H2A.X и MLH1. Клетки на стадии лептотены содержали короткие участки формирующегося СК, окруженные дисперсными облаками хроматина, меченного γ H2A.X. В зиготене мы наблюдали частичный или полный асинопсис хромосом, такие участки были отмечены интенсивным сигналом γ H2A.X. Начало пахитены характеризовалось синапсисом более 90% аутосом, преимущественной локализацией γ H2A.X на половых хромосомах и его точечным появлением на аутосомах. В клетках на стадии средней-поздней пахитены мы наблюдали сигналы MLH1 на большинстве аутосом, в то время как сигнал γ H2A.X присутствовал только на половых хромосомах. На стадии диплотены сигналы MLH1 постепенно исчезали, так же, как и синапсис гомологичных хромосом. Для дальнейшего анализа мы выбирали клетки на стадии средней-поздней пахитены, если мейотический арест не наблюдался на более ранних стадиях.

Так как хромосомные плечи у полевок трудно различать с помощью обычного кариотипирования (Lemskaya et al., 2010, 2015), мы оценивали типы перестроек у гетерозигот на основе формирующихся в профазе I синаптических конфигураций.

Электронная микроскопия препаратов распластанных хромосом

Для анализа препаратов СК с помощью электронного микроскопа стекла окрашивали нитратом серебра (Howell and Black, 1980) и покрывали пленкой из растворенного в хлороформе 1% пластика. С помощью 2% плавиковой кислоты

вырезанную часть препарата снимали со стекла и помещали на сеточки для электронной микроскопии. Готовые высушенные сеточки исследовали под электронным микроскопом JEM-1400 (JEOL, Токио, Япония) при 80 кВ в центре коллективного пользования ИЦиГ.

C-подобное окрашивание DAPI для выявления C-конститутивного гетерохроматина

C-окрашивание проводили на препаратах распластанных сперматоцитов после иммуноокрашивания согласно протоколу, описанному А.П. Лисачевым (2013). Стекла промывали в 2xSSC в течение 5 минут, затем дегидратировали в серии спиртов по 3 мин: 70%, 80% и 100%. Препараты высушивали и инкубировали в 0,2N HCl при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Стекла переносили в насыщенный раствор гидроксида бария при 55°C на 5 мин и затем инкубировали в 2xSSC при 55-60°C в течение 60 мин. Затем препараты покрывали раствором с реагентом, снижающим интенсивность выгорания (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories).

G-окрашивание

К клеточной культуре *M. mystacinus*, полученной из межреберной ткани, любезно выращенной И.Е. Пристяжнюк, добавляли колцемид (1мг на 1 мл среды), оставляли на три часа. Затем промывали клетки в DPBS, добавляли 0.25% трипсин и оставляли на 5 минут при 37°C. Клетки, которые приобрели округлую форму, вымывали средой, осаждали центрифугированием при 1300 оборотах в минуту в течение 6 минут с последующим добавлением гипотонического 0.56% раствора KCl, в котором клетки оставляли на 25 минут при 37°C. Префиксацию проводили несколькими каплями смеси метанола и уксусной кислоты в пропорции 3:1 на льду. Центрифугированием удаляли раствор и проводили фиксацию клеток в течение 20 минут на льду, трижды меняя фиксатор.

Из приготовленной клеточной суспензии С.А. Романенко были получены препараты метафазных хромосомных пластинок. Состаренные препараты в течение часа при 60°C помещали в 0.12% раствор трипсина, разведенного в PBS, при комнатной температуре на 40 секунд, затем промывали 2xSSC. Окрашивали 10% красителем Гимза (BioVitrum), разведенном в воде, в течение 30 секунд и промывали в воде.

Получение Cot-10 ДНК

ДНК выделяли фенол-хлороформным методом из печени, сердца и почек *P. campbelli*, растворяли в TE-буфере. Полученную чистую ДНК фрагментировали с помощью ультразвукового дезинтегратора в течение 2 мин при частоте 22 кГц. Средний размер

фрагментов составил примерно 300 п.н. Концентрацию озвученной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. ДНК концентрацией 3,5 мг/мл подвергали денатурации в течение 10 минут при 100°C и помещали в лед для предотвращения ренатурации.

Реассоциацию ДНК проводили в течение 40 минут при 60°C с добавлением 0.2N раствора NaCl. Оставшиеся в растворе одноцепочечные последовательности удаляли с помощью S1 эндонуклеазы в течение 75 минут при 37°C из расчета 15 е.а./мг исходной ДНК.

Осаждение проводили 0,8 объемами изопропанола в течение ночи при -20°C, центрифугировали 10 минут при 11000 об/мин и растворяли в TE буфере. Концентрация полученной Cot-10 ДНК составила примерно 4 мкг/мл с выходом около 38% от общего количества ДНК.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)

FISH проводилась С.А. Романенко (лаборатория Цитогенетики животных ИМКБ СО РАН) по стандартному протоколу (Romanenko et al., 2006). Ранее было показано, что для представителей группы Палеарктических хомячков, к которым относятся *P. sungorus* и *P. campbelli*, наиболее подходящим инструментом для выявления гомологичных районов являются гибридизационные пробы к хромосомам сирийского (золотистого) хомячка *Mesocricetus auratus* (Romanenko et al., 2006, 2007). Для проведения флуоресцентной гибридизации использовали гибридизационные пробы X-хромосомы *M. auratus*, полученные путем сортировки методом проточной цитофлуорометрии, в качестве конкурентной ДНК использовали Cot-10 ДНК *P. campbelli*.

Статистический анализ

В ходе иммунофлуоресцентного анализа использовали клетки с неповрежденным СК; учитывали только расположенные на СК сигналы MLH1. С помощью программы MicroMeasure3.3 (Reeves, 2001) проводили измерение основных рекомбинационных характеристик (длины СК и числа обменов на хромосоме).

Для построения рекомбинационных карт были определены позиции сигнала MLH1 относительно центромеры и вычислены частоты локализации MLH1 на биваленте в интервалах, равных приблизительно 1 мкм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета R (v4.1.3) (R Core Team, 2019), для визуализации статистических расчетов использовали пакет

ggplot2 (v.1.0.7) (Wickham, 2016). В ходе статистических операций мы использовали: попарный критерий Вилкоксона с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение для сравнения наблюдаемого и ожидаемого соотношения сперматид к сперматоцитам I; H-критерий Крускала-Уоллиса для проверки схожести распределений MLH1 у разных групп; критерий Колмогорова-Смирнова для сравнения распределения сигналов MLH1 вдоль одних и тех же бивалентов; однопропорциональный z-критерий для определения различий в частоте классов между группами эксперимента; t-тест Стьюдента и t-test Велча для сравнения общего количества сигналов MLH1 на клетку, с поправкой Бонферрони на множественное сравнение, где необходимо. На выбор критерия влияли размер выборки и особенности характеристик распределения.

Данные в текстовых таблицах представлены в виде средних значений и стандартных отклонений или стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1 Гибридная стерильность у представителей рода *Alexandromys*, триба *Arvicolini*

Анализ последовательных этапов кариотипической эволюции от индивидуальной изменчивости к дивергенции между популяциями, хромосомными расами и, наконец, видами особенно важен для нашего понимания роли хромосомных перестроек в видообразовании. Современная версия гипотезы хромосомного видообразования указывает на важность хромосомных перестроек в ограничении потока генов между популяциями/видами. Известно, что хромосомные перестройки могут приводить к серьезным нарушениям мейоза: неправильной сегрегации хромосом в метафазе I или серьезным нарушениям синапсиса и рекомбинации. Это в свою очередь, вызывает гибель гамет и, как следствие, – гибридную стерильность. Однако остается неясным, какое число перестроек является достаточным условием для формирования гибридной стерильности, а также какой должна быть сложность самих перестроек.

Внутривидовые гибриды *A. evoronensis* и межвидовые гибриды прямого и обратного направлений скрещиваний полевок *A. evoronensis*, *A. mujanensis* и *A. maximowiczii* близкородственных видов рода *Alexandromys* (Рис. 2) являются хорошей моделью для изучения формирования гибридной стерильности на ранних этапах видообразования в контексте хромосомного видообразования. Эти виды характеризуются малыми эволюционными расстояниями и высокой кариотипической дивергенцией.

A. maximowiczii демонстрирует как внутри-, так и межпопуляционный полиморфизм по ряду центромерных сдвигов, инверсий, слияний и полноплечевых транслокаций (Kartavtseva et al., 2008; Lemskaya et al., 2010). Среди *A. mujanensis* были описаны гетерозиготы по периферическим инверсиям или центромерным сдвигам в четырех парах хромосом (Lemskaya et al., 2015; Kartavtseva et al., 2019). Кариотипы хромосомные расы *A. evoronensis* «Арги» и «Эворон» отличаются друг от друга по серии полноплечевых хромосомных слияний/разделений и для каждой из рас был описан хромосомный полиморфизм по ряду центромерных сдвигов, инверсий, слияний и полноплечевых транслокаций (Kartavtseva et al., 2021a, 2021b). Хромосомные перестройки, различающие кариотипы *A. evoronensis*, *A. mujanensis* и *A. maximowiczii*, до сих пор не описаны с помощью точных цитогенетических методов. Время дивергенции между этими тремя видами оценивается примерно в 110 тыс. лет (Bannikova et al., 2010, 2019), однако было показано, что их межвидовые гибриды обоих полов стерильны (Meyer, 1994; Meyer et al., 1996).

1.1 Гистологический анализ гибридов рода *Alexandromys*

Для оценки степени нарушения гаметогенеза нами было проведено гистологическое исследование гонад межвидовых гибридов, гибридов между разными популяциями и хромосомными расами одного вида, в сравнении с гонадами особей родительских видов.

1.1.1 Особенности сперматогенеза у внутривидовых гетерозигот по хромосомным перестройкам

Гистологический анализ выявил нормальное строение семенников у всех представителей родительских видов и межпопуляционных гибридов между потомками особей *A. evoronensis*, отловленных близ села Чегдомын (EVA-1), и потомками особей, отловленных на берегах реки Арги (EVA-2). Расстояние между этими пунктами около 450 км по прямой. Во всех исследованных образцах мы не обнаружили нарушений клеточного цикла эпителия семенных канальцев (Рис. 3А, Б). Среднее соотношение сперматид к сперматоцитам I у EVA1 × EVA2 составляло 3.61:1, что существенно не отличалось от наблюдаемого у самцов EVA (3.35:1) (попарный критерий Вилкоксона, $P = 0,44$). Анализ методом TUNEL выявил небольшое количество апоптотических клеток в некоторых канальцах этих самцов. У двух межрасовых гибридов *A. evoronensis* «Арги» × *A. evoronensis* «Эворон» мы наблюдали ту же картину (Рис. 3В, Г). Однако у одного гибрида *A. evoronensis* «Арги» × *A. evoronensis* «Эворон» сперматогенез проходил только до стадии ранних сперматоцитов. Отношение сперматид к сперматоцитам было значительно ниже, чем у его братьев (0.05:1), попарный критерий Вилкоксона, $P = 8,4 \cdot 10^{-12}$).

1.1.2 Особенности сперматогенеза у межвидовых гибридов *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* и *A. evoronensis*

У всех межвидовых гибридов были выявлены нарушения сперматогенеза различной степени. Степень прохождения сперматогенеза была вариабельной для разных семенных канальцев гибрида *A. tujanensis* × *A. maximowiczii*. В некоторых из них сперматогенез останавливался на стадии пахитены, и мы наблюдали накопление сперматоцитов. В других канальцах мы детектировали как округлые, так и удлиненные сперматиды и незрелые аномальные сперматозоиды, хотя и в небольшом количестве (Рис. 2Д). Круглые сперматиды были одиночными или агрегированы в многоядерные синцитиальные элементы разного размера, сходные с описанием у Мейер с соавт. (1996) для гибридов этого скрещивания.

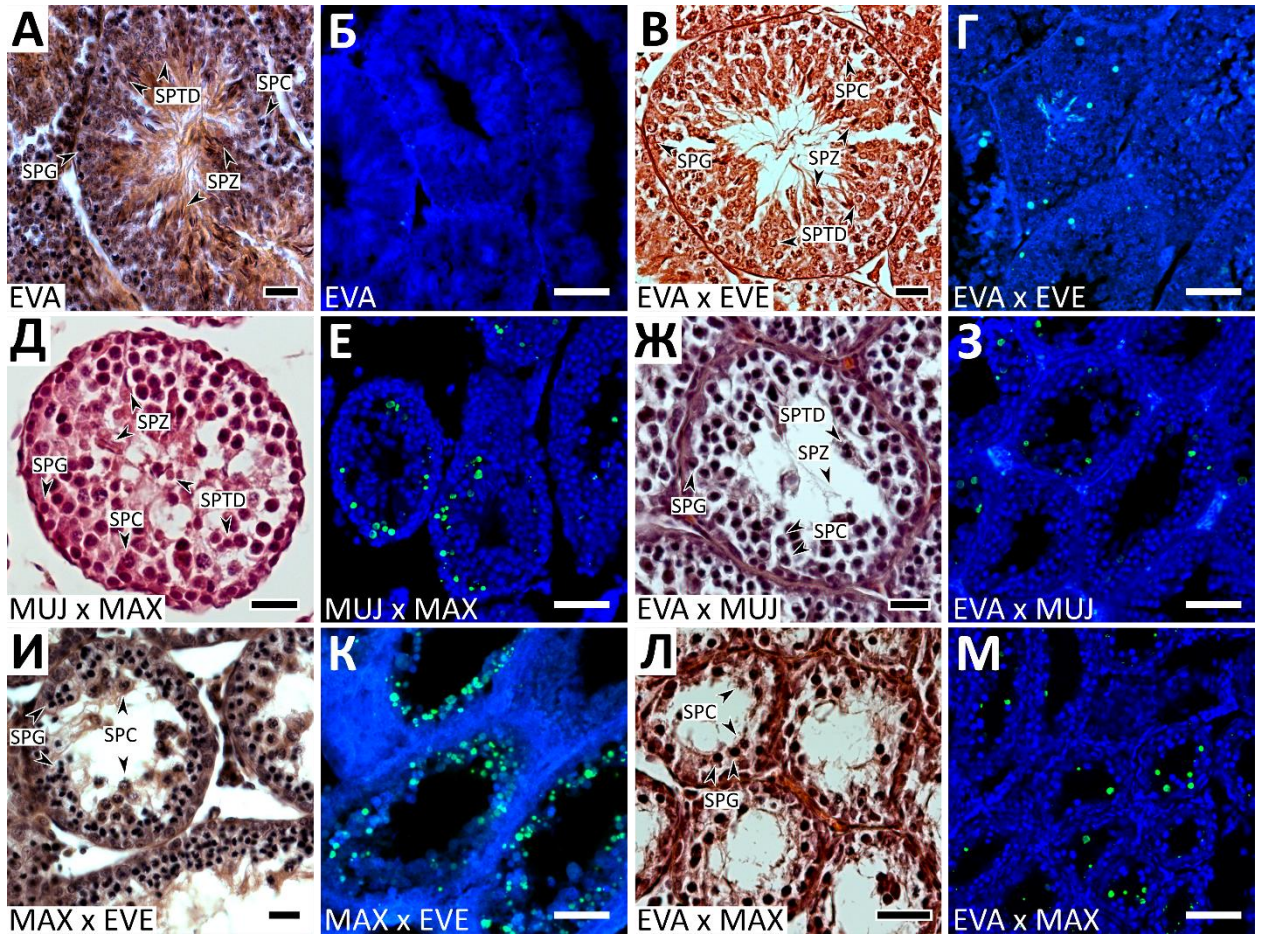


Рисунок 3. Гистологические срезы семенных канальцев *A. evoronensis* «Арги» (EVA, А, Б), *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Эворон» (EVE, В, Г), *A. mujanensis* x *A. maximowiczii* (MUJ x MAX, Д, Е), *A. evoronensis* «Арги» x *A. mujanensis* (EVA x MUJ, Ж, З), *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» (MAX x EVE, И, К) и *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* (EVA x MAX, Л, М). Первый и третий столбцы: окрашивание гематоксилин-эозином. Второй и четвертый столбцы: окрашивание методом TUNEL, который позволяет детектировать апоптотические клетки сперматогенного эпителия. Синий – DAPI, зеленый – TUNEL. SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм.

Отношение сперматид к сперматоцитам I было значительно снижено у гибрида *A. mujanensis* x *A. maximowiczii* (1.35: 1) по сравнению с наблюдаемым у самцов родительских видов (попарный тест Вилкоксона, $P = 4.7 \cdot 10^{-8}$). Это указывает на остановку сперматогенеза в части канальцев на стадии сперматид. В некоторых канальцах мы наблюдали гибель сперматоцитов (Рис. 2Е).

Срезы семенников одного гибрида *A. evoronensis* «Арги» x *A. mujanensis* были схожи с таковыми у *A. mujanensis* x *A. maximowiczii* (Рис. 3Ж, З). Отличие касалось количества и внешнего вида сперматид. Они были менее многочисленны и образовывали меньше многоядерных клеточных элементов. Мы обнаружили несколько незрелых сперматозоидов. У другого гибрида *A. evoronensis* «Арги» x *A. mujanensis* сперматогенез останавливался на стадии сперматоцитов I, с последующим их накоплением. Такую же картину мы наблюдали у реципрокного гибридного самца *A. mujanensis* x *A. evoronensis* «Арги». Среднее соотношение сперматид и сперматоцитов I у гибридов, полученных от обоих скрещиваний, было значительно ниже (0.15:1), чем у родительских особей (попарный критерий Вилкоксона, $P = 7,9 \cdot 10^{-14}$).

У трех гибридов *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» сперматогенез проходил до стадии пахитены, с последующей гибелью сперматоцитов (Рис. 3И, К). У двух гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* сперматогенез останавливался на стадии сперматоцитов I, при этом клеточный пул сперматоцитов был уменьшен (Рис. 3Л, М). Еще у двух гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* сперматогенез продвинулся до стадии сперматид. Мы детектировали в канальцах несколько сперматид, изолированных или объединенных в многоядерные образования. При этом у всех гибридов *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» и *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* сперматозоидов в канальцах не наблюдалось. Средние отношения сперматид к сперматоцитам I у гибридов *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» (0.05:1) и у гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* (0.13:1) были достоверно ниже по сравнению с родительскими видами (попарный критерий Вилкоксона, $P = 2,0 \cdot 10^{-15}$ и $P < 10^{-16}$, соответственно).

Таким образом, у всех родительских видов, межпопуляционных и всех, кроме одного, межрасовых гибридов мы наблюдали половые клетки на всех стадиях сперматогенеза, при этом отношение сперматид к сперматоцитам I не отличалось у гибридов и родительских видов, что свидетельствует о потенциальной фертильности самцов. Однако у всех самцов межвидовых гибридов сперматогенез был заметно нарушен. При этом гибриды различались по степени нарушения гаметогенеза. Наиболее тяжелые aberrации и остановка сперматогенеза преимущественно на стадии мейоцитов с

последующим апоптозом половых клеток наблюдались у гибридов между *A. maximowiczii* и *A. evoronensis*. Гибриды *A. mujanensis* с этими двумя видами показывали менее выраженные нарушения.

1.2 Цитогенетический анализ гибридов рода *Alexandromys*

Согласно данным гистологического анализа семенных канальцев сперматогенез не был нарушен у внутривидовых гибридов между разными хромосомными расами, тогда как у всех межвидовых гибридов полевок *A. evoronensis*, *A. mujanensis* и *A. maximowiczii* сперматогенез останавливался на стадии мейоза в части канальцев или во всех канальцах. Для выявления цитологических механизмов формирования гибридной стерильности мы проанализировали особенности синапсиса и рекомбинации хромосом с помощью метода иммунолокализации SYCP3, SYCP1, MLH1 и γ H2A.X. SYCP3 и SYCP1 маркируют боковой и центральный элементы СК, соответственно (Zickler and Kleckner, 2015), MLH1 – маркер поздних рекомбинационных узелков (Guillon et al., 2005). γ H2A.X вовлечен в путь репарирования двуниевых разрывов ДНК и мейотическую инактивацию неспаренного хроматина, в том числе – мейотический сайленсинг половых хромосом (Turner, 2015).

Животные, участвовавшие в анализе, различались по типу и сложности ожидаемых синаптических конфигураций. Самцы родительских видов были либо кариотипическими гомозиготами, либо простыми гетерозиготами по одной или нескольким перестройкам: слияниям хромосом, транслокациям, перичентрическим инверсиям и/или центромерным сдвигам. В клетках на стадии пахитены кариотипически гомозиготных самцов мы ожидали детектировать биваленты без нарушений синапсиса. Клетки у простых гетерозигот по слияниям хромосом должны содержать триваленты, состоящие из метацентрической хромосомы и ее акроцентрических партнеров (Forejt, 1979; Garagna et al., 2014). Простые гетерозиготы по инверсиям или смещениям центромер должны демонстрировать гетероморфные биваленты с инверсионными петлями или со смещенными центромерами (Poorman et al., 1981; Moses et al., 1982; Torgasheva and Borodin, 2010). У сложных гетерозигот по многим хромосомным перестройкам в ходе гомологичного синапсиса могут образовываться мультиваленты в форме цепочек или колец (Matveevsky and Kolomiets, 2016; Belonogova et al., 2017; Borodin et al., 2019).

1.2.1 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов *A. maximowiczii*, *A. mujanensis* и *A. evoronensis*, гетерозиготных по хромосомным перестройкам

Alexandromys maximowiczii

Два из четырех исследованных самцов *A. maximowiczii* были гомозиготными по всем хромосомам, полиморфным у этого вида. У этих самцов мы наблюдали полноценный синапсис и рекомбинацию аутосом и половых хромосом. Почти все аутосомные биваленты были полностью синаптированы (Рис. 4А-В). В 3% (1 из 61) клеток на стадии средней-поздней пахитены у одного самца была обнаружена пара унивалентов. Большинство бивалентов имели по крайней мере один сигнал MLH1 (Рис. 4А-В). X- и Y-хромосомы синаптировали друг с другом, образуя половой бивалент (Рис. 4А-В, Рис. 5А-Б) и половое тельце, которое было покрыто облаком γ H2A.X, что указывает на его транскрипционную инактивацию (Рис. 5В).

Два других самца *A. maximowiczii* были гетерозиготами по разным вариантам хромосом. В пахитенных препаратах одного из них мы наблюдали полностью синаптированные гетероморфные биваленты среднего размера с двумя невыровненными центромерами (Рис. 4Б). Мы не наблюдали сигналов MLH1 в участке бивалента между центромерами, тогда как другая часть бивалента всегда содержала один сигнал MLH1. Такое распределение поздних рекомбинационных узелков характерно для гетерозигот по перичентрической инверсии в случае, когда инвертированная область негомологично синаптирована с неинвертированным партнером и, следовательно, кроссинговер оказывается полностью подавленным (Torgasheva and Borodin, 2010).

В клетках на стадии пахитены у четвертого самца *A. maximowiczii* мы обнаружили три гетероморфных бивалента (Рис. 4В). У двух из них (небольшого и среднего размера) первая центромера находилась на конце бивалента, а вторая – в середине. Это указывает на гетерозиготность по перичентрической инверсии или центромерному сдвигу. Третий гетероморфный бивалент представлял собой крупный метацентрик, содержащий шпильку в прицентромерной области, причем одна центромера располагалась на вершине шпильки, а другая — в ее основании. Вероятно, это следствие гетерозиготности по амплификации перичентрического хроматина. Размер шпильки варьировал между клетками. В некоторых клетках структура отсутствовала, а центромеры были выровнены вследствие синаптической подгонки (Рис. 6). Подобная мейотическая конфигурация была обнаружена ранее у нескольких самцов *Microtus arvalis* (Borodin et al., 1992).

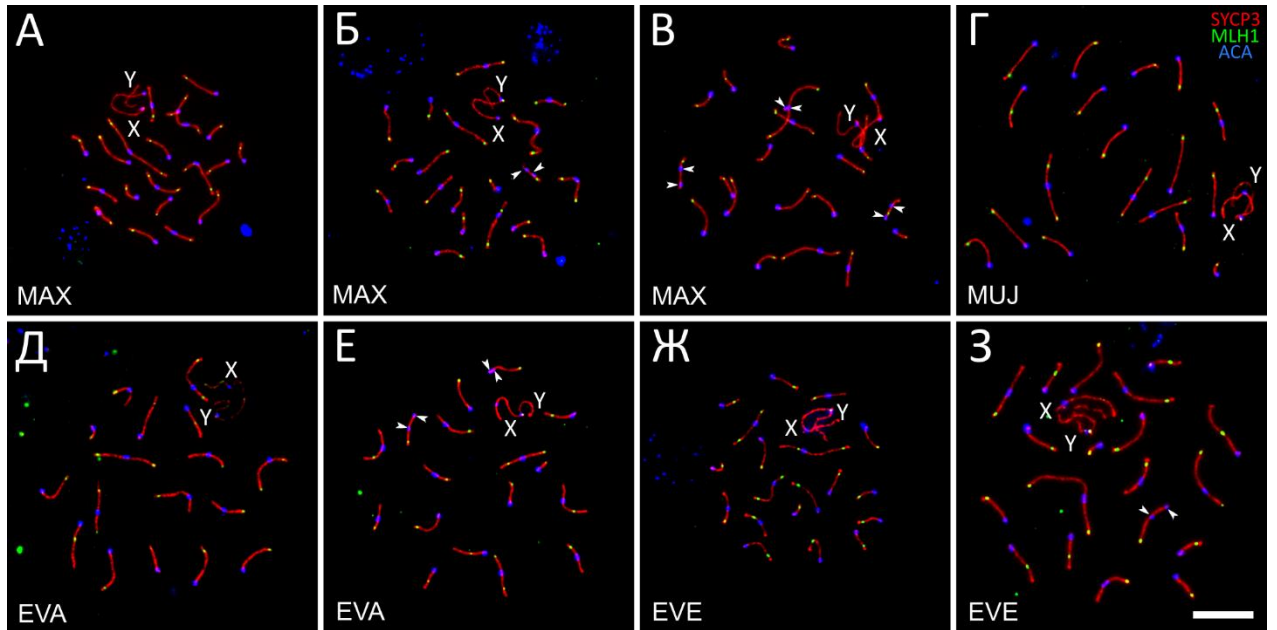


Рисунок 4. Сперматоциты на стадии пахитены *A. maximowiczii* (MAX, А – В), *A. tujanensis* (MUJ, Г), *A. evoronensis* «Арги» (EVA, Д, Е) и *A. evoronensis* «Эворон» (EVE, Ж, З). Представители родительских видов были гомозиготами по хромосомным перестройкам (А, Г, Д, Ж) или гетерозиготами (Б, В, Е, З). Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. Стрелки указывают на невыровненные центромеры гетероморфных бивалентов. Масштаб – 10 мкм.

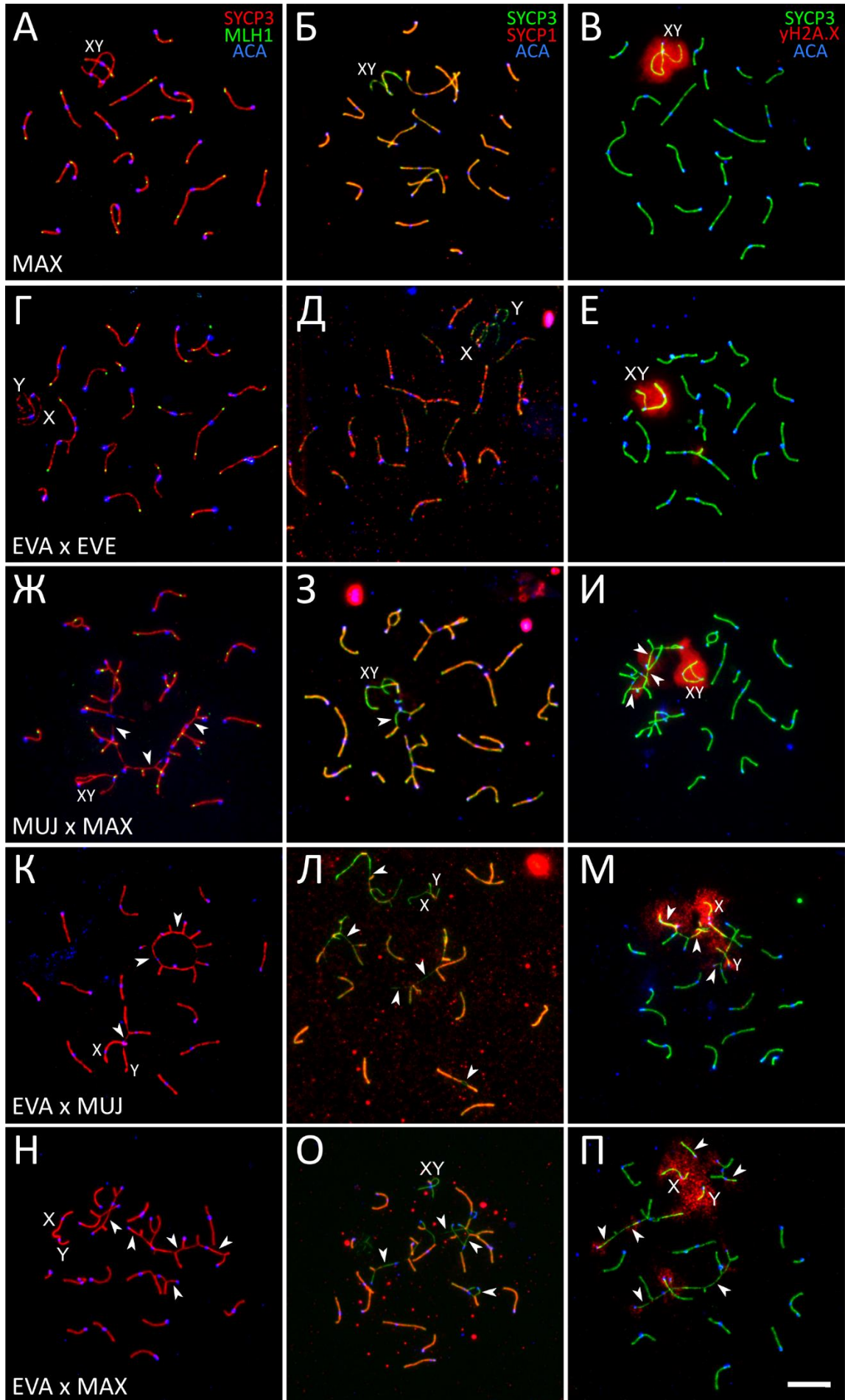


Рисунок 5. Сперматоциты на стадии пахитены или пахитено-подобной стадии полевок рода *Alexandromys*. Первая строка: клетки на стадии пахитены у родительского вида *A. maximowiczii* (МАХ, А-В). Вторая строка: клетки на стадии пахитены у межпопуляционных гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Эворон» (EVA x EVE, Г-Е). Третья строка: клетки на пахитено-подобной стадии у межвидовых гибридов *A. tuijanensis* x *A. maximowiczii* (МУЖ x МАХ, Ж-И). Четвертая строка: клетки на пахитено-подобной стадии у межвидовых гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. tuijanensis* (EVA x МУЖ, К-М). Пятая строка: клетки на пахитено-подобной стадии у межвидовых гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* (EVA x МАХ, Н-П). Столбцы соответствуют иммуноокрашиванию мейотических белков: MLH1, SYCP1 и γ H2A.X, соответственно. Стрелки указывают на униваленты или асинаптрированные районы хромосом, половые хромосомы обозначены X и Y. Масштаб – 10 мкм.

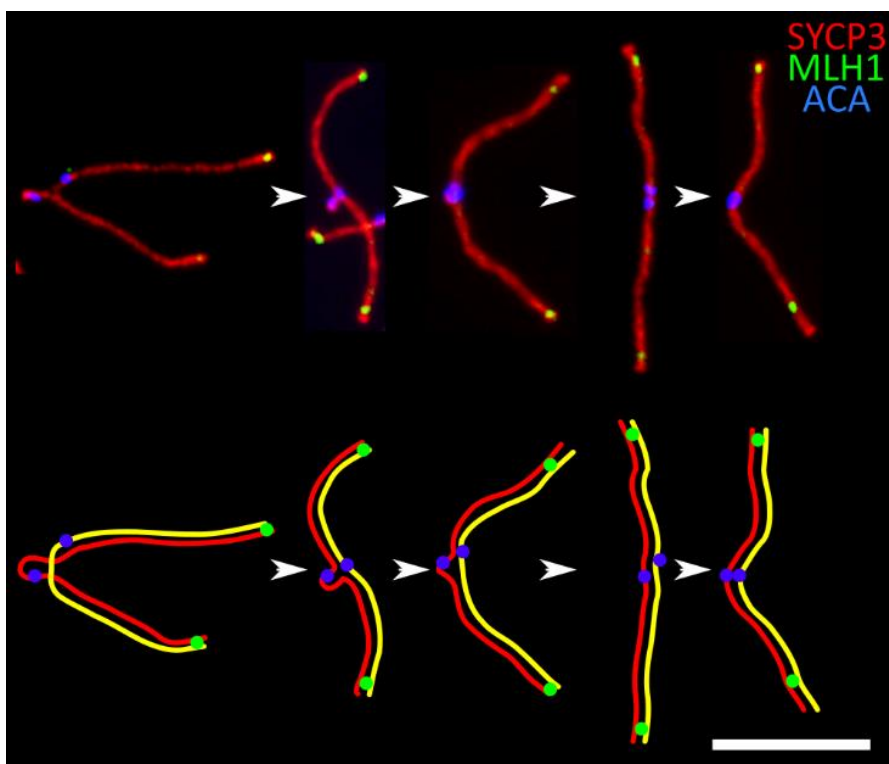


Рисунок 6. Динамика синаптической подгонки гетероморфного бивалента в сперматоцитах *A. maximowiczii* (верхний ряд) и соответствующие схематичные изображения СК (нижний ряд). Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. Масштаб – 10 мкм.

Alexandromys mujanensis

Все три самца *A. mujanensis*, использованные в этом эксперименте, были гомозиготными по хромосомам, для которых ранее были описаны полиморфные варианты (Lemskaya et al., 2015; Kartavtseva et al., 2019). Мы не наблюдали нарушений синапсиса и рекомбинации аутосомом и половых хромосом (Рис. 4Г).

Alexandromys evoronensis «Арги»

Два самца *A. evoronensis* «Арги»-2 оказались гомозиготными по всем хромосомам, полиморфным у этой расы. Все 17 аутосомных бивалентов и половой бивалент ХУ демонстрировали нормальный синапсис и рекомбинацию на стадии пахитены (Рис. 4Д). Мы не обнаружили аутосомных унивалентов ни в одной из исследованных клеток (Таблица 3).

Таблица 3. Цитогенетические характеристики сперматоцитов *A. maximowiczii* (MAX), *A. mujanensis* (MUJ), *A. evoronensis* «Арги» (EVA), *A. evoronensis* «Эворон» (EVE), и их внутри- и межвидовых гибридов. Данные приведены в виде среднее±стандартное отклонение в случае числа MLH1 на клетку и среднее±стандартная ошибка среднего в случае представления доли клеток с асинапсисом хромосом.

Самки	Самцы	Пол	2n	FN	Число животных	Число MLH1 на клетку (общее число клеток)	Доля клеток с асинапсисом (%) (общее число клеток)
Родительские виды							
MAX	MAX	♂	40-42	56-60	4	23.9±2.2 (181)	1.0±15.0 (186)
MUJ	MUJ	♂	38	49	3	20.2±1.6 (101)	0 (101)
EVA	EVA	♂	36	53-54	4	20.7±2.0 (172)	5.0±32.0 (153)
EVE	EVE	♂	40	53-54	2	22.0±1.1 (146)	0 (146)
Межпопуляционные гибриды и гибриды между хромосомными расами							
EVA-2	EVA-1	♂	36	54-55	2	20.5±1.5 (105)	0 (105)
EVA-2	EVE	♂	38	53-54	3	21.1±1.3 (109)	0 (109)
Межвидовые гибриды							
MUJ	MAX	♂	41	55	1	21.3±3.3 (31)	100.0±0.0 (31)
EVA	MUJ	♂	37	50	2	нет	100.0±0.0 (30)
MUJ	EVA	♂	37	52	1	нет	100.0±0.0 (7)
MAX	EVE	♂	40	57	3	нет	100.0±0.0 (50)
EVA	MAX	♂	39	55-56	4	23.3±2.2 (4)	100.0±0.0 (107)

Два самца *A. evoronensis* «Арги»-1 были гетерозиготами по перичентрическим инверсиям или центромерным сдвигам в двух парах аутосомом среднего размера. Одна пара состояла из метацентрической и акроцентрической хромосом, а другая из субметацентрической и акроцентрической хромосом. Мы не обнаружили сигналов MLH1 между центромерами гетероморфных бивалентов (Рис. 5Е). У обеих простых гетерозигот перестроенные хромосомы были полностью синаптированы на стадии средней-поздней

пахитены. Мы не наблюдали мечения γ H2A.X на гетероморфных синаптических конфигурациях. Это указывает на то, что перестроенные гомологи завершили синапсис и репарацию двунитевых разрывов, и клетки могут беспрепятственно пройти контрольную точку пахитены.

В результате скрещивания потомков полевок, отловленных в районе берегов реки Арги (*A. evoronensis* «Арги»-2), с потомками полевок, отловленных у села Чегдомын (*A. evoronensis* «Арги»-1), были получены два межпопуляционных гибридных самца. У одного из гибридов в сперматоцитах на стадии пахитены было четыре гетероморфных бивалента, у второго – три гетероморфных бивалента с невыровненными центромерами (Рис. 7А, а-с). Это указывает на простую гетерозиготность по центромерному сдвигу или перичентрической инверсии, или на синапсис хромосом, возникших в результате слияния центромера-центромера в одной популяции и слияния центромера-теломера в другой популяции. Среднее число сигналов MLH1 на клетку было сравнимым с таковым у *A. evoronensis* «Арги» (Рис. 8; Таблица 3, тест Велча, $P = 0,17$).

Alexandromys evoronensis «Эворон»

Один самец был гомозиготой по всем хромосомам, полиморфным для этой расы. Все 19 аутосомных бивалентов и половой бивалент XY демонстрировали нормальный синапсис и рекомбинацию в клетках на стадии средней-поздней пахитенны (Рис. 4Ж). Второй самец был гетерозиготой по центромерному сдвигу в аутосомах среднего размера (Рис. 4З). Во всех клетках мы наблюдали бивалент с одной центромерой на его конце и другой центромерой в середине. В некоторых клетках мы детектировали одиночные сигналы MLH1 между центромерами.

Таким образом, простые гетерозиготы по хромосомам, которые полиморфны в локальных популяциях, демонстрируют нормальный хромосомный синапсис и сравнимый со стандартными гомозиготами уровень мейотической рекомбинации. По объединенным результатам гистологического и цитогенетического анализа можно сделать вывод о том, что фертильность простых гетерозигот у полевок рода *Alexandromys* не должна быть снижена.

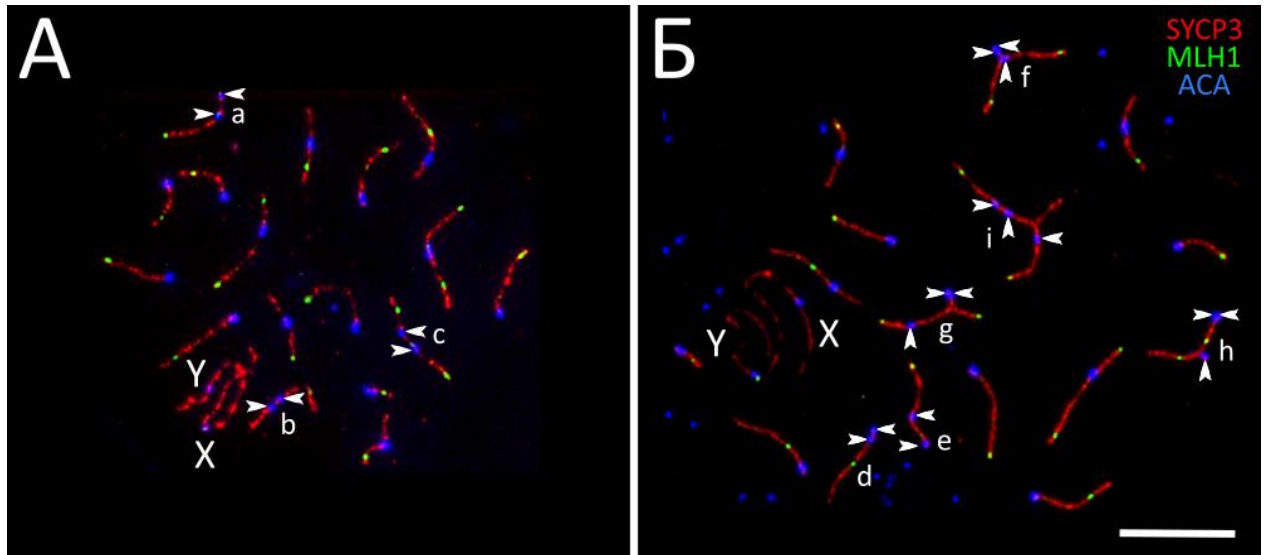


Рисунок 7. Пахитенные сперматоциты межпопуляционных гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Арги» (EVA-1 x EVA-2, А) и *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Эворон» (EVA-2 x EVE, Б). Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. Строчными буквами обозначены гетероморфные биваленты и триваленты, описание которых приведено в тексте. Стрелками показаны невыровненные центромеры гетероморфных бивалентов и тривалентов. Масштаб – 10 мкм.

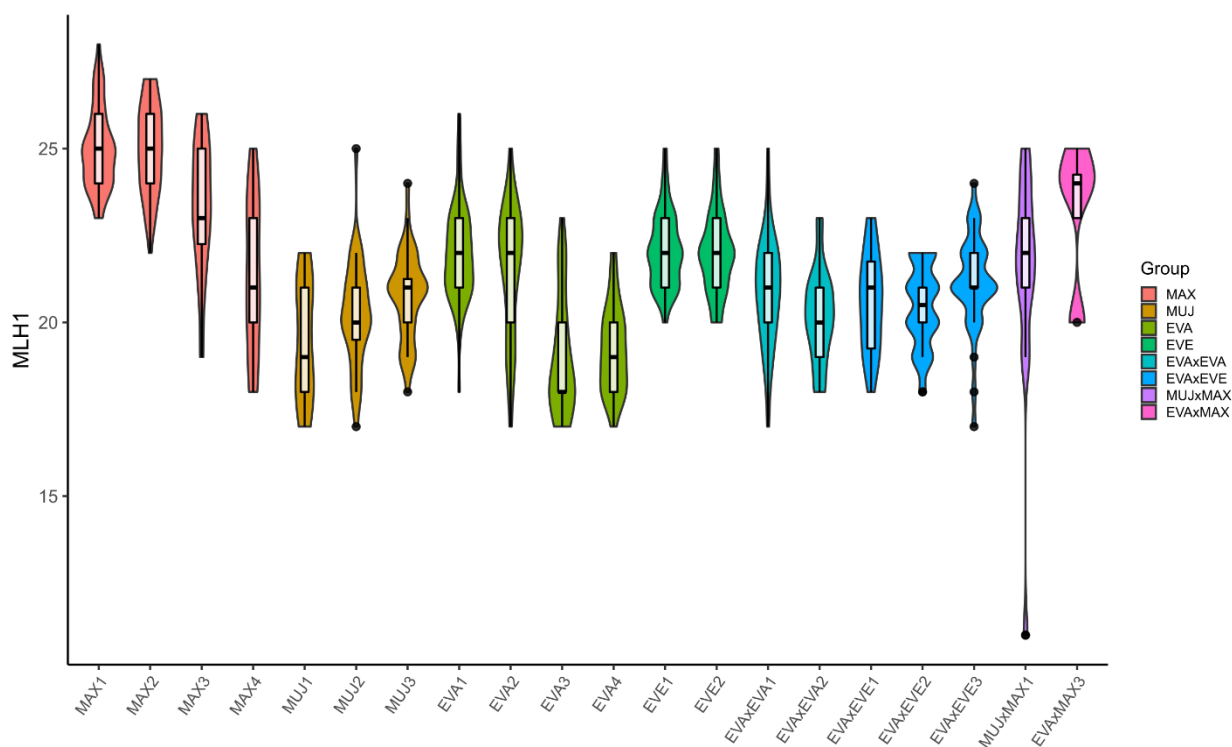


Рисунок 8. Число сигналов MLH1 на клетку для каждой особи *A. maximowiczii* (MAX), *A. tujanensis* (MUJ), *A. evoronensis* «Арги» (EVA), *A. evoronensis* «Эворон» (EVE) и гибридов F1 *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Арги» (EVAxEVA), *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Эворон» (EVAxEVE), *A. tujanensis* x *A. maximowiczii* (MUJxMAX), *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* (EVAxMAX), представленное в виде графика «скрипки» с диаграммой размаха. Генотипические группы обозначены одним цветом.

1.2.2 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межрасовых гибридов *A. evoronensis*

Мы исследовали двух самцов межрасовых гибридов между *A. evoronensis* «Арги»-2 (потомков полевок, отловленных на берегах реки Арги), и *A. evoronensis* «Эворон» (потомков полевок, отловленных у озера Эворон). Расстояние между этими локациями составляет около 500 км по прямой, что примерно соответствует расстоянию между популяциями *A. evoronensis* «Арги»-1 и *A. evoronensis* «Арги»-2, описанных выше. Однако хромосомная дивергенция межрасовых гибридов *A. evoronensis* «Арги»-2 x *A. evoronensis* «Эворон» была выше чем *A. evoronensis* «Арги»-1 x *A. evoronensis* «Арги»-2. В клетках одного из гибридов мы наблюдали шесть гетероморфных синаптических конфигураций: два бивалента с невыровненными центромерами и четыре тривалента с ярко выраженными боковыми плечами (Рис. 5А-Е, Рис. 7Б).

Один гетероморфный бивалент, вероятно, возник в результате центромерного сдвига в кариотипе у одной из хромосомных рас, поскольку мы регулярно наблюдали рекомбинационные узелки между его невыровненными центромерами (Рис. 7Б, d). У второго гетероморфного бивалента центромеры располагались довольно близко друг к другу. Мы никогда не наблюдали рекомбинационных событий в районе хромосомной перестройки (Рис. 7Б, e), однако это может быть связано с недостаточным размером выборки. По этой причине мы не можем сказать, какая перестройка лежит в основе этой синаптической конфигурации: центромерный сдвиг или перицентрическая инверсия.

Два тривалента образовались вследствие гомологичного синапсиса между двумя акроцентрическими хромосомами с большой метацентрической (Рис. 7Б, f) или акроцентрической (Рис. 7Б, g) хромосомами, которые, вероятно, возникли в результате центромерного слияния их гомологов в одной расе и центромеро-теломерного слияния в другой расе. Происхождение двух других тривалентов более сложное. В одном из них метацентрический партнер, по-видимому, возник в результате центромерного слияния двух акроцентриков с последующей перицентрической инверсией (Рис. 7Б, h). Второй сложный тривалент образовался в результате синапсиса трех метацентрических хромосом. Самая большая из них, вероятно, произошла от слияния двух акроцентрических хромосом, каждая из которых стала метацентрической из-за фиксации перицентрических инверсий или центромерных сдвигов (Рис. 7Б, i).

У второго гибрида в клетках наблюдались те же четыре тривалента и один бивалент с сильно смещенными центромерами. Иными словами, в его клетках мы не детектировали второго гетероморфного бивалента с близко расположенными центромерами.

В клетках на стадии ранней и средней пахитены мы наблюдали частичный асинапсис в прицентромерных областях тривалентов. Эти участки были помечены антителами γ H2A.X, что указывает на инактивацию транскрипции неспаренного хроматина. Однако на стадии поздней пахитены проксимальные части акроцентриков обычно были полностью синаптированы либо гомологично метацентрическому партнеру, либо негомологично друг другу, образуя боковые плечи различной длины. Сигналы γ H2A.X пропадали у тривалентов и оставались только на половом пузырьке (Рис. 5E).

Среднее число поздних рекомбинационных узелков на клетку, маркированных MLH1, у этой группы не отличалось от хромосомной расы *A. evoronensis* «Арги», однако мы наблюдали значимые различия между этой группой и хромосомной расой «Эворон» (Рис. 8; Таблица 3, тест Велча, $P = 0,94$ и $P < 10^{-13}$, соответственно).

Таким образом, хромосомная дивергенция между локальными популяциями и хромосомными расами внутри *A. evoronensis* и наличие большого количества гетероморфных синаптических конфигураций у их гибридов F1 не приводит к нарушению синапсиса хромосом, снижению частоты рекомбинации и мейотическому сайленсингу неспаренного хроматина.

1.2.3 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов

Мы обнаружили значительные aberrации хромосомного синапсиса у всех межвидовых гибридов. Однако степень нарушения варьировала между полами, между скрещиваниями, между особями внутри одного скрещивания и между половыми клетками одной особи.

A. tujanensis x *A. maximowiczii*

У самца *A. tujanensis* x *A. maximowiczii* степень мейотических аномалий была наиболее легкой в сравнении с другими гибридами (Рис. 5Ж-И, Рис. 9А; Таблица 3). Униваленты аутосом встречались редко. Число различных типов синаптических конфигураций у гибрида было близко к ожидаемому при сравнении кариотипов родительских видов, описанных Лемской с соавт. (2010, 2015). Наиболее часто встречающейся комбинацией синаптических конфигураций была следующая: 8-9 гомоморфных бивалентов, 3 гетероморфных бивалента с невыровненными центромерами, 1 гетероморфный бивалент с большой обратной инверсионной петлей, 1-2 тривалента и 1-2 сложных мультивалента, состоящих из 4-17 хромосом.

Гетероморфный бивалент с большой обратной инверсионной петлей часто имел сигнал MLH1 внутри петли (Рис. 5Ж). Эту синаптическую конфигурацию можно интерпретировать как результат гомологичного синапсиса двух акроцентрических хромосом в результате альтернативного центромеро-теломерного слияния одних и тех же предковых акроцентрических хромосом с последующей инактивацией метацентрических центромер и дополнительной дупликацией/транслокацией или синапсиса двух больших неперекрывающихся парацентрических инверсий (Рис. 9А, с`).

Мультивалентные конфигурации обычно появлялись в виде незамкнутых цепей, хотя количество вовлеченных плеч различалось между клетками (Рис. 5Ж-И). Из анализа синаптических конфигураций можно сделать вывод о «наслаивании» хромосомных перестроек внутри одной и той же хромосомы: когда синапсис происходит между разными районами длинной хромосомы и тремя короткими, не по всей их длине. Мы обнаружили рекомбинационные узелки, маркированные MLH1, на каждом синаптированном элементе СК (Рис. 5Ж). При этом, уровень рекомбинации не был снижен, в сравнении с *A. tujanensis* (Рис. 8; Таблица 3, тест Велча, $P = 0,073$). Небольшое число асинаптированных областей СК не было помечено антителами к SYCP1 (Рис. 5З) и несло сигнал γ H2A.X (Рис. 5И). Мы предполагаем, что почти завершённые синапсис и рекомбинация позволили части сперматоцитов преодолеть точку контроля пахитены. Однако эти клетки не достигали конца сперматогенеза, по-видимому, из-за нарушений транскрипционной инактивации несинаптированного хроматина, которая играет важную роль впоследствии на стадии сперматид.

A. evoronensis x *A. tujanensis* и *A. evoronensis* x *A. maximowiczii*

У самцов гибридов *A. evoronensis* с *A. tujanensis* и *A. maximowiczii* мы выявили более выраженное подавление синапсиса и рекомбинации (Рис. 5К-П, Рис. 9). Мы также наблюдали «наслаивание» хромосомных перестроек внутри одной хромосомы. Два гибрида прямого и обратного скрещивания между *A. tujanensis* и *A. evoronensis* «Арги», три гибрида *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* и три гибрида *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» почти не показали наличия поздних рекомбинационных узелков (Рис. 5К, Н). У одного самца *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* некоторые сперматоциты достигали стадии средней пахитены и почти на всех синаптированных плечах наблюдались сигналы MLH1 (Рис. 8; Таблица 3). Среднее число сигналов MLH1 на клетку не отличалось от родительских видов (Таблица 3, тест Велча, $P > 0,1$).

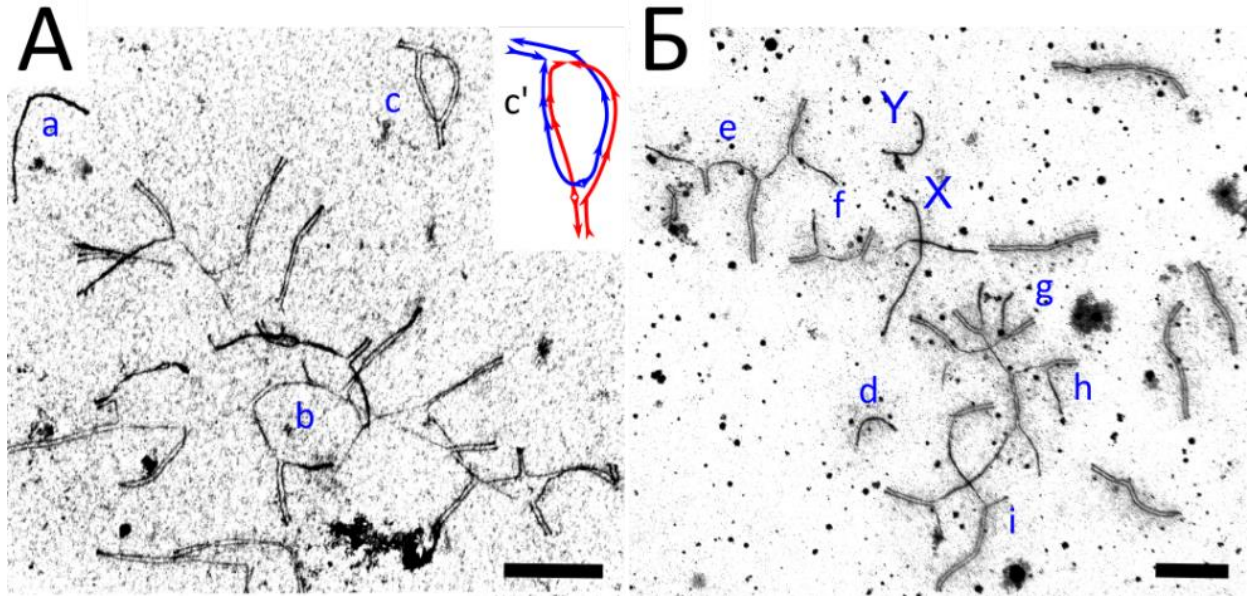


Рисунок 9. Пахитено-подобные сперматоциты межвидовых гибридов *A. tuijanensis* x *A. maximowiczii* (MUJ x MAX, А) и *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Арги» (MAX x EVA, Б) после окрашивания нитратом серебра, выявленные с помощью метода электронной микроскопии. Строчными буквами обозначены гетероморфные синаптические конфигурации: униваленты – а, d; мультиваленты – b, e-h; инверсионная петля – с и ее схематическое изображение – с'. Масштаб – 5 мкм.

Мы не обнаружили различий в синапсисе хромосом реципрокных гибридов *A. evoronensis* «Арги» x *A. mujanensis* и *A. mujanensis* x *A. evoronensis* «Арги». В их наиболее прогрессивных сперматоцитах I находилось около 8-9 гомоморфных бивалентов, 1-2 гетероморфных бивалента, 1-4 сложных мультивалента, состоящих из 5-21 хромосом. Клетки различались числом мультивалентных цепей и числом элементов, вовлеченных в каждую из них (Рис. 5К-М). У большинства цепей были асинаптированы терминальные плечи и прицентромерные области внутренних плечей. Мы также наблюдали униваленты. Они, как и мультиваленты из небольшого числа элементов, по-видимому, возникали из-за топологических трудностей сборки полных мультивалентных цепей.

Униваленты и асинаптические области мультивалентов не содержали сигнала SYCP1 (Рис. 5Л, О) и интенсивно метились γ H2A.X (Рис. 5М, П), что указывает на широкое распространение нерепарированных двунитевых разрывов и мейоз-специфическую инактивацию неспаренного хроматина. По-видимому, эти aberrации инициировали массовый апоптоз первичных сперматоцитов, который мы наблюдали при гистологическом анализе этих гибридов.

Наиболее сильные нарушения мейоза мы наблюдали у одного самца *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii*. Мейоз остановился на зиготеноподобной стадии. В клетках гибрида большинство бивалентов и все мультиваленты были асинаптированы. При этом в каждой из клеток было не менее 11 унивалентов, а в некоторых сперматоцитах синапсис даже не начинался.

Таким образом, синапсис хромосом был нарушен у всех межвидовых гибридов полевок рода *Alexandromys*. Наиболее частой aberrацией был полный или частичный асинапсис гомологичных хромосом в бивалентах и сложных цепочках мультивалентов, сопровождающийся возникновением унивалентов. Это приводило к задержанной репарации двунитевых разрывов ДНК и транскрипционному сайленсингу асинаптированного хроматина. Однако в большинстве синаптируемых участков хромосом мы обнаружили сигналы MLH1, маркирующие поздние рекомбинационные узелки. Это свидетельствует о сохранении высокой степени гомологии между последовательностями ДНК гомеологичных участков хромосом недавно дивергировавших видов рода *Alexandromys*.

Мы обнаружили значительную дивергенцию в степени мейотических нарушений у межрасовых и межвидовых гибридов полевок *A. maximowiczii*, *A. mujanensis* и *A. evoronensis*, кариотипы которых различаются по числу и типу хромосомных перестроек, а время дивергенции составляет около 110 тыс лет. Несмотря на серию хромосомных

перестроек между родительскими группами, особенности синапсиса внутривидовых гибридов не влияли на успешное прохождение мейоза. Все межвидовые гибриды оказались сложными гетерозиготами по многим хромосомным перестройкам. Резкое уменьшение числа рекомбинационных событий на клетку вместе с увеличением сложности гетероморфных синаптических конфигураций, а также наличие протяженных асинаптических участков у межвидовых гибридов полевок *Alexandromys* приводило к мейотическому аресту на зиготено- или пахитеноподобных стадиях. Вероятно, множественная комплексная гетерозиготность по перестройкам является основной причиной стерильности межвидовых гибридов.

2 Гибридная стерильность у представителей подрода *Microtus*, триба Arvicolini

Гипотеза хромосомного видообразования оказывается неприменимой к случаям формирования гибридной стерильности у видов с одинаковыми кариотипами. Было показано, что высокая генетическая дивергенция при отсутствии кариотипической может также приводить к нарушению основных процессов мейоза или сказываться на дальнейшем формировании гамет и, как следствие, потомство двух видов оказывается стерильным.

Для исследования роли генетической дивергенции, а также вовлеченности кариотипической дивергенции в формирование гибридной стерильности на ранних этапах видообразования мы выбрали в качестве модели серию межвидовых гибридов между близкородственными видами европейской линии рода *Microtus* подрода *Microtus*, а именно: *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*, *M. kermanensis* x *M. mystacinus*, *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis*, *M. arvalis* «obscurus» x *M. kermanensis*, *M. kermanensis* x *M. transcaspicus* (Рис. 2). Время дивергенции родительских видов полевок составляет около 60-250 тысяч лет (Mahmoudi et al., 2017; Golenishchev et al., 2019).

Для этих видов характерна низкая кариотипическая дивергенция: ранее было высказано предположение, что кариотипы *M. kermanensis*, *M. mystacinus* и *M. rossiaemeridionalis* не отличаются по крупным хромосомным перестройкам, тогда как вида *M. arvalis* было характерно накопление большого числа перестроек в процессе видообразования. Так, кариотипы *M. arvalis* «obscurus» и *M. rossiaemeridionalis* отличаются по 14 крупным хромосомным перестройкам, а кариотипы *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis* отличаются только по 8 перестройкам, в числе которых инверсии и транслокации (Mazurok et al., 2001).

Известно, что гибридные самцы и самки от скрещиваний между *M. rossiaemeridionalis*, *M. arvalis* и *M. transcaspicus* стерильны (Meyer et al., 1996). Степень

гибридной стерильности между *M. mystacinus*, с одной стороны, и *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis*, с другой стороны, ранее исследована не была, так как таксономический статус *M. mystacinus* был неясен до последнего времени из-за недостатка биологического материала (Musser and Carleton, 2005; Mahmoudi et al., 2017).

2.1 Гистологический анализ гибридов подрода *Microtus*

С помощью тестовых скрещиваний было показано, что самцы межвидовых гибридов подрода *Microtus* стерильны. Однако самки гибридов скрещиваний между *M. rossiaemeridionalis*, *M. kermanensis* и *M. mystacinus* фертильны, что согласуется с правилом Холдейна (Golenishsev et al., 2000; Vikchurina et al., 2021). Для оценки нарушения сперматогенеза мы провели гистологический анализ семенников гибридов основных групп скрещиваний, различающихся по степени генетической дивергенции.

В качестве контроля были исследованы самцы всех пяти видов. Мы не обнаружили аномалий в строении семенников и в клеточном цикле сперматогенного эпителия (Рис. 10А). Отношение сперматид к сперматоцитам I у *M. mystacinus*, используемого в качестве контрольной группы, составило 3.4 ± 0.3 , что близко к ожидаемому 4:1. Метод детекции апоптотических клеток TUNEL не выявил таковых в семенных канальцах самцов родительских видов (Рис. 10Б).

2.1.1 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis*

У семи гибридов прямого и обратного скрещивания были выявлены различные нарушения сперматогенеза: от его полной остановки на стадии сперматогоний до практически нормального сперматогенеза, с продукцией зрелых, но аномальных сперматозоидов.

У самца *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*⁴ строение семенников было сравнимо с контрольным. В просвете семенных канальцев присутствовали зрелые сперматозоиды (Рис. 10В). В некоторых канальцах этого самца мы наблюдали сперматиды, агрегированные в многоядерные клеточные образования, при этом соотношение сперматид к сперматоцитам было нарушено (попарный критерий Вилкоксона, $P < 0.01$) (Рис. 10Г). Похожий фенотип наблюдался у пяти других гибридов: *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*¹⁻³, *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*¹ и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*³. Отношение сперматид к сперматоцитам I было значительно снижено у гибридов и отличалось от ожидаемого 4:1 *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*¹, *M.*

kermanensis x *M. rossiaemeridionalis*3, *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*1 и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*3 (1.2 ± 1.3 , попарный критерий Вилкоксона, $P = 8 \cdot 10^{-4}$; 1.0 ± 0.9 , $P = 3 \cdot 10^{-4}$; 0.6 ± 0.6 , $P = 3 \cdot 10^{-4}$; 0.5 ± 0.5 , $P = 4 \cdot 10^{-4}$, соответственно). Согласно данным соотношениям мы можем сделать вывод об остановке сперматогенеза в части канальцев до образования сперматид. Некоторые семенные канальцы были либо пустыми, либо заполнены клеточным дебрисом. В части канальцев у *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*1, *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*3 и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*4 сперматогенез останавливался на стадии профазы I мейоза, тогда как у *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*1 и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*3 возможная остановка сперматогенеза на стадии сперматоцитов I наблюдалась во многих канальцах. В канальцах, где наблюдался мейотический арест, были детектированы TUNEL-положительные клетки. Единичные аномальные зрелые сперматозоиды были обнаружены в сперматогенном эпителии у *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*1 и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*3; в канальцах *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*2, *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis*3 и *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*1 находились сперматозоиды на более ранних стадиях формирования.

У гибрида *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*2 мы детектировали аномальное строение семенника с гиперплазией соединительной и интерстициальной ткани и пустыми семенными канальцами: в просвете канальцев клеточных элементов не наблюдалось. Остановка сперматогенеза происходила на стадии сперматогоний, следовательно, ни одна клетка не вступала в мейоз (Рис. 10Д). Мы не наблюдали TUNEL-положительных клеток на срезах семенных канальцев у самца *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*2 (Рис. 10Е).

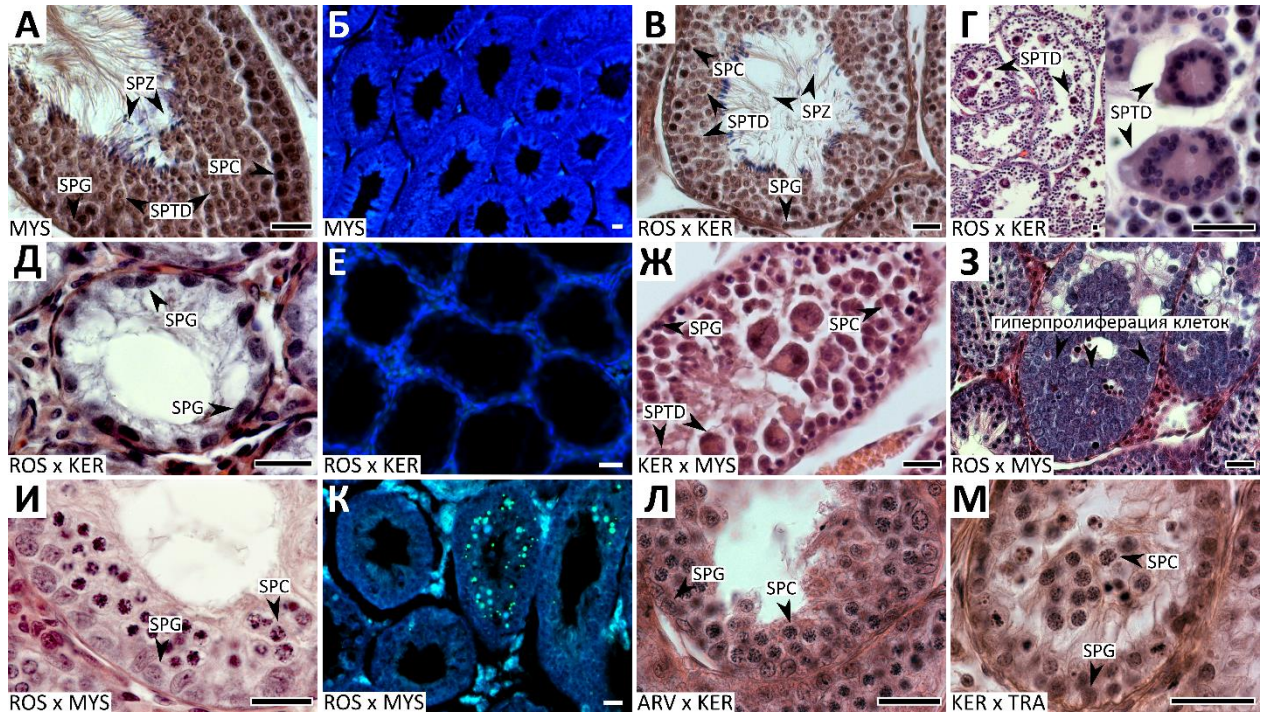


Рисунок 10. Гистологические срезы семенных канальцев *M. mystacinus* (MYS, А, Б), *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* (ROS x KER, В–Е), *M. kermanensis* x *M. mystacinus* (KER x MYS, Ж), *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* (ROS x MYS, З–К), *M. arvalis* x *M. kermanensis* (ARV x KER, Л) и *M. kermanensis* x *M. transcaspicus* (KER x TRA, М). Первый, третий и четвертый столбцы: окрашивание гематоксилин-эозином. Второй столбец: окрашивание методом TUNEL, который позволяет детектировать апоптотические клетки сперматогенного эпителия. Синий – DAPI, зеленый – TUNEL. SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм.

2.1.2 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. mystacinus*

Практически у всех гибридов этой группы сперматогенез проходил до стадии сперматид, при этом в ряде канальцев происходила остановка мейоза и накопление сперматоцитов на стадии пахитены. Четыре гибридных самца направления *M. kermanensis* x *M. mystacinus* были достаточно однородной группой, однако для двух особей сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, были более частым явлением (Рис. 10Ж). Гибриды обратного направления демонстрировали более радикальные фенотипы стерильности. У самца *M. mystacinus* x *M. kermanensis*² в ходе сперматогенеза формировались редкие аномальные сперматозоиды, тогда как у самца *M. mystacinus* x *M. kermanensis*¹ сперматогенез останавливался преимущественно на стадии сперматоцитов I.

2.1.3 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus*

Восемь гибридов направления скрещивания *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* демонстрировали остановку сперматогенеза на стадиях от сперматоцитов I до аномальных сперматозоидов. У четырех особей мы наблюдали аномальные незрелые сперматозоиды и уменьшенный пул сперматид, при этом у трех из них в канальцах содержались сперматиды, агрегированные в многоядерные шарообразные синцитиальные элементы. У двух гибридов сперматогенез останавливался на стадии сперматид, при этом вследствие мейотического ареста в части канальцев количество сперматид было уменьшено. Мы выявили остановку сперматогенеза на стадии мейоцитов у самцов *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis*¹ и *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis*⁸.

У восьми гибридных самцов *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* мы не наблюдали в канальцах зрелых сперматид и сперматозоидов при накоплении сперматоцитов I (Рис. 10И). Среднее отношение сперматид к сперматоцитам I было близко к 0:1 против ожидаемого 4:1 и значительно отличалось от родительского вида (0.02 ± 0.09 , попарный критерий Вилкоксона, $P = 1.4 \cdot 10^{-8}$). В канальцах самцов *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*³ и *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*⁵ находились редкие многоядерные шарообразные синцитиальные элементы сперматид. В ряде канальцев у самца *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*² мы обнаружили гиперпролиферацию клеток сперматогенного эпителия (Рис. 103). У всех гибридов между *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* мы детектировали TUNEL-положительные первичные сперматоциты (Рис. 10К).

2.1.4 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов *M. arvalis* и *M. kermanensis*

У трех гибридов между *M. arvalis* «obscurus» и *M. kermanensis* наблюдалась вариация степени нарушений сперматогенеза. У *M. arvalis* «obscurus» x *M. kermanensis*² и *M. arvalis* «obscurus» x *M. kermanensis*³ в некоторых канальцах наблюдалось преобладание клеток на стадии первичных сперматоцитов и выраженный апоптозом клеток на этой стадии. У всех гибридов среднее соотношение сперматид к сперматоцитам I существенно отличалось от ожидаемого 4:1 (0.3 ± 0.4 , попарный критерий Вилкоксона, $P = 6.6 \cdot 10^{-5}$). Аномальные сперматиды и сперматозоиды на ранних стадиях развития были обнаружены только у *M. arvalis* «obscurus» x *M. kermanensis*¹ (Рис. 10Л).

2.1.5 Сперматогенез у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. transcaspicus*

Филогенетическая дистанция между *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* была наибольшей среди всех представленных гибридных групп, однако у межвидовых гибридов данной группы наблюдались те же нарушения сперматогенеза, что и у гибридов между близкородственными видами *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus*. Цикл сперматогенного эпителия у гибридов *M. kermanensis* x *M. transcaspicus* был нарушен. Многие канальцы были заполнены апоптозными первичными сперматоцитами. Число сперматид среди сперматогенного эпителия было крайне мало и значительно отличалось от представителя *M. mystacinus* (0.2 ± 0.6 , попарный критерий Вилкоксона, $P = 2.7 \cdot 10^{-5}$). Мы наблюдали остановку мейоза во всех канальцах (Рис. 10М).

На основании вышеописанных количественных и качественных характеристик сперматогенеза у межвидовых гибридов рода *Microtus* мы выделили несколько типов нарушений:

1. сперматогенез доходит до зрелых аномальных сперматозоидов;
2. сперматогенез доходит до сперматид;
3. сперматогенез доходит до сперматид с нарушениями: в канальцах наблюдаются сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, но самих сперматид немного;
4. сперматогенез останавливается на стадии сперматоцитов I;
5. сперматогенез останавливается на стадии сперматогоний.

Самым распространенным нарушением среди гибридов близких видов *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* была остановка сперматогенеза на стадии сперматид, с мейотическим арестом в части канальцев. Мейотический арест часто наблюдался

практически среди всех гибридов между более генетически и кариотипически далекими видами: *M. kermanensis* с одной стороны и *M. arvalis* “obscurus” и *M. transcaspicus*, с другой стороны.

2.2 Цитогенетический анализ гибридов подрода *Microtus*

Согласно данным гистологического анализа динамики сперматогенеза у стерильных межвидовых гибридов, степень нарушения сперматогенеза варьировала у гибридов между разными видами, между гибридами прямого и реципрокного скрещивания и внутри одного скрещивания. Для выявления цитологических механизмов формирования гибридной стерильности мы проанализировали особенности синапсиса хромосом, рекомбинации и эпигенетических модификаций хроматина у гибридов, родительские виды которых различались по степени генетической и хромосомной дивергенции. Мы использовали метод иммулокализации нескольких белков, специфически экспрессирующихся на разных подстадиях профазы I мейоза: SYCP3, SYCP1, MLH1 и γ H2A.X.

2.2.1 Сравнение кариотипов *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus*

Так как число хромосом и плеч ($2n = 54$, FN = 56, Таблица 4) было одинаковым для всех трех близкородственных видов *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus*, мы предположили, что кариотипы видов не различаются по хромосомным перестройкам. Косвенно это подтверждают данные C- и NOR-окрашивания *M. kermanensis* и *M. mystacinus* Махмуди с соавт. (2018).

Проведенное совместно с С.А. Романенко G-окрашивание метафазных хромосом *M. mystacinus* в сравнении с ранее опубликованным кариотипом *M. rossiaemeridionalis* (Lemskaya et al., 2010) показало, что кариотипы этих двух видов не отличаются по крупным хромосомным перестройкам: делециям, дупликациям или инверсиям (Рис. 11). Один из самцов *M. mystacinus* являлся гетерозиготой по ранее описанной в литературе перичентрической инверсии первой хромосомы (Mahmoudi et al., 2018) (Рис. 11Б).

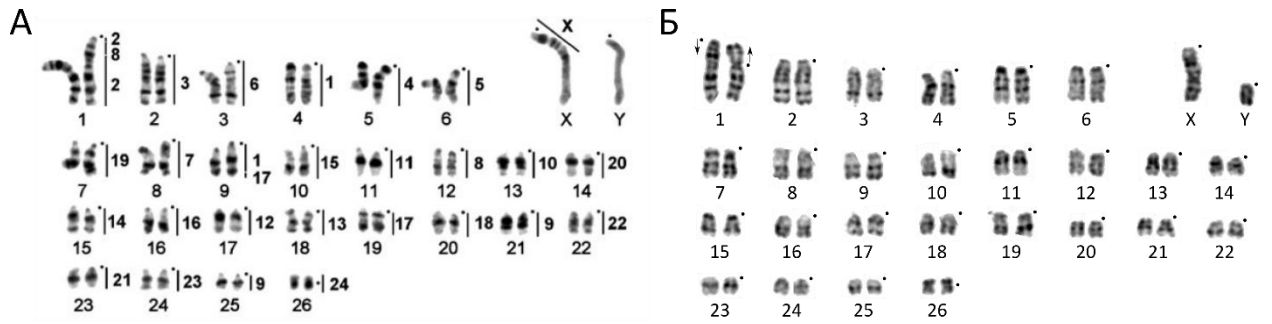


Рисунок 11. G-окрашивание кариотипов *M. rossiaemeridionalis* (А) с локализацией хромосомных сегментов *M. agrestis* (вертикальные линии справа) (Lemskaya et al., 2010) и *M. mystacinus* (Б). Черные точки маркируют позиции центромеры. Стрелка обозначает инверсию участка первой хромосомы.

2.2.2 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов родительских видов подрода *Microtus*

У особей родительских видов *M. kermanensis*, *M. mystacinus*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. transcaspicus* и *M. arvalis* «arvalis» мы наблюдали синапсис аутосом и рекомбинацию, типичные для серых полевок (Borodin et al., 2012; Basheva et al., 2014a; Torgasheva and Borodin, 2016). В сперматоцитах не было обнаружено аутосомных унивалентов или мультивалентов. Половые хромосомы были локализованы совместно и образовывали половое тельце, однако были полностью асинаптированы. Половое тельце было плотно покрыто облаком антител к γ H2A.X, что свидетельствует о его инактивации (Рис. 12А-В). Полный и постоянный асинапсис половых хромосом характерен для всех представителей подрода *Microtus* и является единственным вариантом нормы (Borodin et al., 2012).

Таблица 4. Цитогенетические характеристики сперматоцитов I *M. kermanensis* (KER), *M. rossiaemeridionalis* (ROS), *M. mystacinus* (MYS), *M. arvalis* “obscurus” (ARV), *M. transcaspicus* (TRA) и их F1 гибридов. Данные приведены в виде среднее±стандартное отклонение в случае числа MLH1 на клетку и среднее±стандартная ошибка среднего в случае представления доли клеток с асинапсисом хромосом.

Самки	Самцы	2n	FN	Число животных	Число MLH1 на клетку (общее число клеток)	Доля клеток с асинапсисом (%) (общее число клеток)
Родительские виды						
ARV	ARV	46	83	1	29.6±2.2 (28)	2.4±2.4 (41)
KER	KER	54	56	1	28.0±1.3 (29)	0 (31)
MYS	MYS	54	56-58	4	26.6±1.0 (125)	1.6±0.9 (184)
ROS	ROS	54	56	4	28.1±1.5 (135)	1.0±0.7 (200)
TRA	TRA	52	54	1	26.8±1.1 (32)	0 (39)
Межвидовые гибриды						
ARV	KER	50	64	3	нет	100.0±0.0 (146)
KER	MYS	54	56-57	4	25.1±2.5 (71)	46.8±3.6 (190)
KER	ROS	54	56	3	26.6±1.0 (131)	17.0±2.5 (223)
KER	TRA	53	55	2	нет	100.0±0.0 (46)
MYS	KER	54	56-57	2	28.6±1.7 (38)	59.6±5.1 (94)
MYS	ROS	54	56-57	8	27.3±1.7 (144)	38.5±2.5 (369)
ROS	KER	54	56	4	27.9±1.5 (79)	12.2±2.2 (230)
ROS	MYS	54	56	8	27.1±1.8 (17)	76.0±2.3 (358)

2.2.3 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis*

Результаты цитогенетического анализа нарушений сперматогенеза гибридов между *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis* подтверждали и дополняли результаты гистологического анализа. Мы не обнаружили сперматоцитов на распластаных препаратах хромосом у гибрида *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* так же, как и на

гистологических срезах. Синапсис и рекомбинация большинства аутосом не были нарушены у гибрида *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis*⁴, морфологическая структура семенника которого была сравнима с контрольной.

Нарушения синапсиса были обнаружены у остальных гибридов этой группы. Большинство пахитенных сперматоцитов гибридов содержали полностью синаптированные аутосомы. Завершенность синапсиса маркировал SYCP1, сигнал которого был детектирован по всей длине бивалента. У нескольких небольших по размеру бивалентов наблюдалась задержка синапсиса вблизи теломерных районов. В 12,7% (61 из 482) клеток находилось до шести аутосомных унивалентов: маленькие акроцентрические и метацентрические хромосомы (Рис. 12Г-Д). Аутосомные униваленты и половые хромосомы активно метились антителами к γ H2А.Х, что указывает на присутствие нерепарированных двуцепочечных разрывов ДНК и транскрипционный сайленсинг асинаптированного хроматина (Рис. 12Е).

Число сигналов MLH1 на клетку, не было снижено у самцов гибридов по сравнению с родительским видом *M. rossiaemeridionalis* (Таблица 4, тест Велча, $P = 0,11$). Это подтверждает высокий уровень гомологии между геномами родительских видов и доказанное выше предположение о сходстве кариотипов родительских видов. На самом деле снизить уровень рекомбинации у серой полевки рода *Microtus sensu lato* практически невозможно, поскольку он близок к числу облигатных хиазм: около 1,2 на бивалент (Torgasheva and Borodin, 2016).

Таким образом, у всех стерильных гибридов *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis*, прямого и обратного направления скрещиваний, кроме одного, мы наблюдали близкий к родительским видам уровень рекомбинации и низкую частоту частичного или полного асинапсиса некоторых аутосомных бивалентов.

2.2.4 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. mystacinus*

Разброс по стадиям остановки сперматогенеза хорошо согласуется со степенью нарушений синапсиса и рекомбинации у гибридов между *M. kermanensis* и *M. mystacinus*. Процент клеток с полностью завершенным синапсисом аутосом варьировал от 30% до 90% среди гибридов направления скрещивания *M. kermanensis* x *M. mystacinus* и от 0% до 76% для направления скрещивания *M. mystacinus* x *M. kermanensis*. В случае, когда в клетке на стадии пахитены было небольшое число асинаптированных аутосом, все неспаренные

хромосомы были небольшого размера и маркировались сигналом γ H2A.X, тогда как сигнал SYCP1 на них никогда не наблюдался. Среднее число сайтов MLH1 на клетку составило $25,1 \pm 2.5$ у гибридов *M. kermanensis* x *M. mystacinus*, что значительно отличалось от родительских видов (тест Велча $P < 10^{-5}$), и 28.6 ± 1.7 у гибрида *M. mystacinus* x *M. kermanensis*2, что было сравнимо с *M. kermanensis* (тест Велча $P > 0.10$) и значительно отличалось от гибридов *M. kermanensis* x *M. mystacinus* (тест Велча $P < 10^{-13}$) (Таблица 4).

2.2.5 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus*

У гибридов данной группы наблюдалась выраженная асимметрия скрещивания. Мейоз пяти из восьми гибридов направления скрещивания *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* проходил до стадии поздней пахитены во многих семенных канальцах, и сопровождался разной степенью нарушения синапсиса. Процент полностью синаптированных бивалентов варьировал от 80% до 98%, тогда как у оставшихся трех особей синапсис был завершен лишь в 2-11% клеток. Наиболее частым нарушением синапсиса были униваленты, несущие сигналы γ H2A.X при отсутствии сигнала SYCP1 (Рис. 12Ж-И). Число поздних рекомбинационных узелков, маркированных MLH1, в сперматоцитах на стадии пахитены у гибридов *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* было сходным с числом сайтов кроссинговера у родительских видов (Рис. 13; Таблица 4, тест Велча $P > 0.05$).

Большинство сперматоцитов у гибридов направления скрещивания *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* остановились в развитии на стадии зиготены (Рис. 12Ж-И). Наиболее прогрессивная стадия профазы I наблюдалась у гибрида *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*2. Несмотря на наличие нехарактерной гиперпролиферации клеток в некоторых канальцах, паттерн синапсиса гомологичных хромосом у гибрида *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*2 был близок к норме и аналогичен описанному выше для гибрида между *M. rossiaemeridionalis* и *M. kermanensis*. Так, у этой особи более 40% сперматоцитов содержали полностью синаптированные аутосомные биваленты, тогда как у остальных особей этого направления скрещивания процент клеток с асинаптированными аутосомами был более 96%. Число сигналов MLH1 в пахитенных мейоцитах у *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus*2 не отличалось от числа сайтов рекомбинации у гибридов обратного направления скрещивания (Рис. 13; Таблица 4, тест Велча $P > 0.05$).

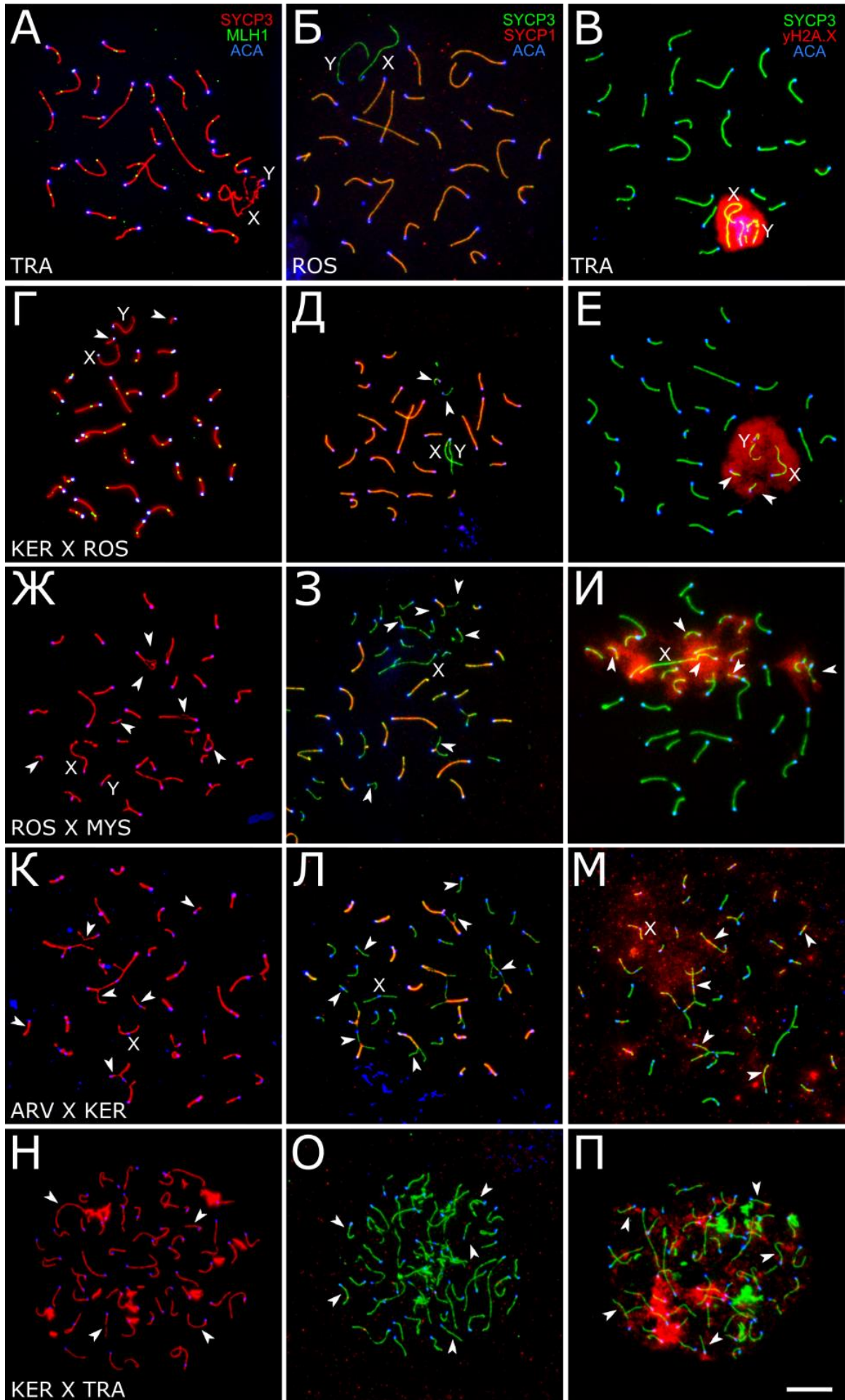


Рисунок 12. Сперматозоиды полевок и их межвидовых гибридов F1 на разных стадиях профазы I. Первая строка: клетки на стадии пахитены у родительских видов *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis* (TRA, А, В; ROS, Б). Вторая строка: клетки на стадии пахитены у межвидовых гибридов с идентичными кариотипами родительских видов *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis* (KER x ROS, Г-Е). Третья строка: клетки на стадии зиготены у межвидовых гибридов с идентичными кариотипами родительских видов *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* (ROS x MYS, Ж-И). Четвертая строка: клетки на стадии зиготены у межвидовых гибридов с различными кариотипами родительских видов *M. arvalis* x *M. kermanensis* (ARV x KER, К-М). Пятая строка: клетки на стадии лептотены у межвидовых гибридов с различными кариотипами родительских видов *M. kermanensis* x *M. transcaspicus* (KER x TRA, Н-П). Столбцы соответствуют иммуноокрашиванию мейотических белков: MLH1, SYCP1 и γ H2A.X, соответственно. Стрелки указывают на униваленты или асинаптированные районы хромосом; половые хромосомы обозначены X и Y. Масштаб: 10 мкм.

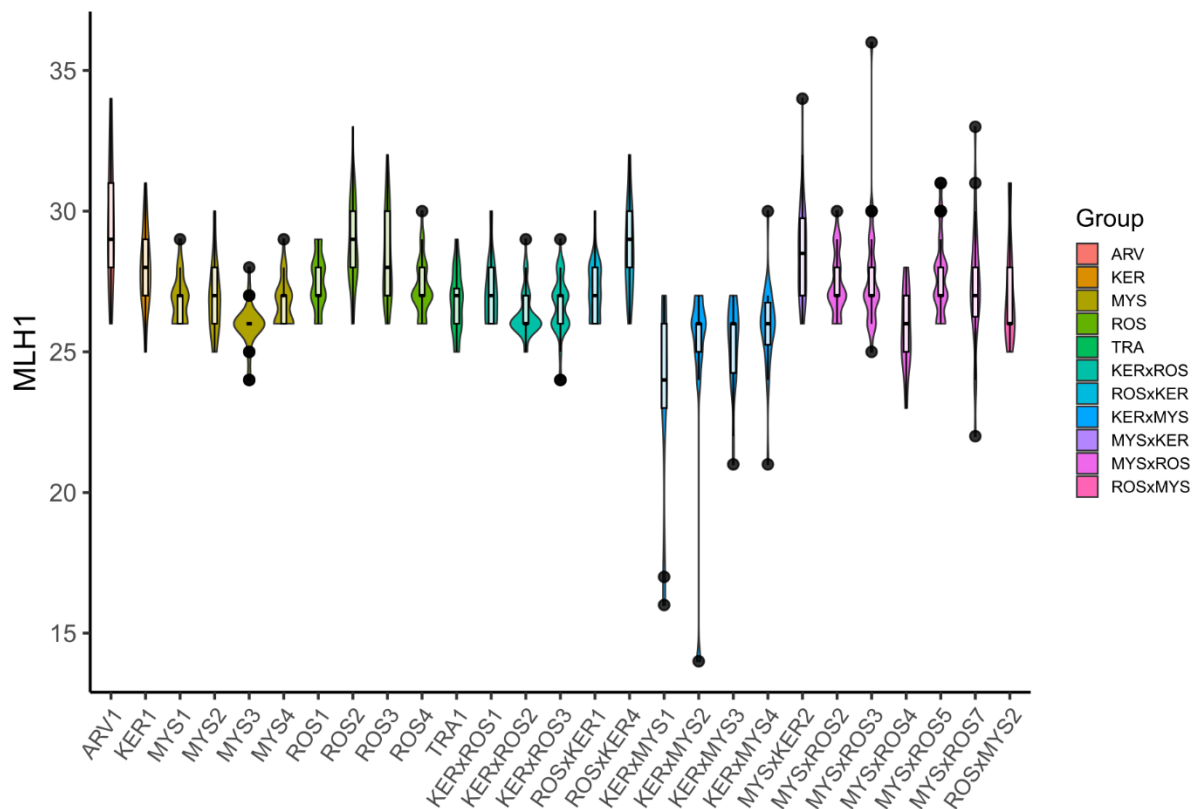


Рисунок 13. Число сигналов MLH1 на клетку для каждой особи *M. arvalis* (ARV) *M. kermanensis* (KER), *M. mystacinus* (MYS), *M. rossiaemeridionalis* (ROS), *M. transcaspicus* (TRA) и гибридов F1 *M. kermanensis* x *M. mystacinus* (KERxMYS), *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis* (KERxROS), *M. mystacinus* x *M. kermanensis* (MYSxKER), *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* (MYSxROS), *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* (ROSxKER), *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* (ROSxMYS), представленное в виде графика «скрипки» с диаграммой размаха. Генотипические группы обозначены одним цветом.

2.2.6 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов *M. arvalis* и *M. kermanensis*

Мы наблюдали серию синаптических нарушений у трех гибридов *M. arvalis* x *M. kermanensis*. Вероятно, синапсис хромосом был затруднен вследствие значительной кариотипической дивергенции между родительскими видами (Рис. 12К). Кариотипы G-бэндинга высокого разрешения были описаны ранее у *M. arvalis* «obscurus» и *M. rossiaemeridionalis*, однако подобная работа не была проведена для *M. kermanensis*. Кариотипы *M. arvalis* «obscurus» и *M. rossiaemeridionalis* различаются по одной Робертсоновской транслокации, трем тандемным слияниям, пяти перицентрическим инверсиям и пяти центромерным сдвигам (Mazurok et al., 2001). На основании этих данных, подтвержденной идентичности кариотипов *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* и предположении об идентичности кариотипов *M. rossiaemeridionalis* и *M. kermanensis*, мы ожидали обнаружить следующие синаптические конфигурации у гибридов *M. arvalis* «obscurus» x *M. kermanensis*: 4 тривалента, 7 гетероморфных бивалентов с одной центромерой в прителомерном участке и другой центромерой в середине, 1 гетероморфный бивалент с двумя центромерами на противоположных концах и 11 гомоморфных бивалентов (один метацентрический и десять акроцентрических).

Среди 146 исследованных клеток мы не обнаружили ни одной, содержащей все описанные конфигурации. Сперматоцит с наибольшим количеством ожидаемых синаптических конфигураций содержал 11 гомоморфных бивалентов, 8 частично синаптированных гетероморфных бивалентов, 2 тривалента и 6 унивалентов. В двух клетках встречались все ожидаемые триваленты. В 6,1% клеток мы наблюдали тетраваленты, образованные в результате негомологичных хромосомных ассоциаций в перицентромерных районах. Во всех клетках присутствовал хотя бы один гетероморфный бивалент, при этом треть клеток не содержала гомоморфных бивалентов.

Не несущие сигнала SYCP1 униваленты были наиболее частым мейотическим нарушением (Рис. 14Л). Их число варьировало от 5 до 48. Многие клетки содержали нечетное количество унивалентов, что указывает на то, что некоторые из их гомологов были вовлечены в негомологичный синапсис. Таким образом, сперматоциты гибридов *M. arvalis* x *M. kermanensis* различались по числу и типам нарушений синапсиса; мейоз останавливался на стадии зиготены.

Рекомбинация у гибридов *M. arvalis* x *M. kermanensis* была полностью подавлена. Сигналы MLH1 наблюдались в единичных клетках. Хроматин унивалентов и

асинапсированных районов бивалентов и тривалентов всех трех гибридов обнаруживал характерные признаки нерепарированных двуцепочечных разрывов ДНК и транскрипционного сайленсинга: множественные сигналы γ H2A.X (Рис. 12М).

2.2.7 Синапсис и рекомбинация хромосом в пахитене у самцов межвидовых гибридов *M. kermanensis* и *M. transcaspicus*

В сперматоцитах двух самцов гибридов между видами с наибольшей генетической дистанцией *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* мы наблюдали все признаки полного нарушения синапсиса, что согласуется с данными гистологического анализа (Рис. 12Н). Сигнал SYCP1, белка центрального элемента СК, отсутствовал во всех исследованных клетках (Рис. 12О). Многочисленные сигналы γ H2A.X локализовались вдоль асинапсированных боковых элементов всех хромосом клетки (Рис. 12П). Следовательно, у самцов гибридов между *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* остановка мейоза произошла на стадии лептотены.

Таким образом, мы обнаружили вариацию в степени мейотических нарушений у межвидовых гибридов полевок подрода *Microtus*. Время дивергенции исследуемых в данной работе видов этого рода составляет около 60-250 тыс лет. При этом кариотипы *M. arvalis* и *M. transcaspicus*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. kermanensis* и *M. mystacinus* отличаются от кариотипов *M. rossiaemeridionalis*, *M. kermanensis* и *M. mystacinus* по нескольким хромосомным перестройкам. Хромосомный асинапсис, по-видимому, был основной причиной остановки мейоза. Степень асинапсиса широко варьировала между клетками, между особями одного скрещивания, между направлениями одного скрещивания и между разными скрещиваниями — от частичного асинапсиса нескольких небольших бивалентов до полного асинапсиса всех хромосом. Обогащение мечением γ H2A.X районов асинапсиса свидетельствует о наличии неспаренных двунитевых разрывов ДНК и, как правило, сопровождается транскрипционным сайленсингом неспаренного хроматина. Это, вероятно, стало основной причиной стерильности межвидовых гибридов.

3 Гибридная стерильность у представителей рода *Phodopus*

Непохожим на описанные выше случаем является гибридная стерильность между двумя близкородственными видами мохноногих хомячков, *P. sungorus* и *P. campbelli* (Рис. 2). Данные виды дивергировали около 0.8-1 млн лет назад (Neumann et al., 2006), их кариотипы различаются только по размеру и положению гетерохроматиновых блоков ($2n=28$, FN=54, Таблица 5) (Romanenko et al., 2007). Однако единственное ранее описанное нарушение в мейозе затрагивало только синапсис половых хромосом (Ishishita et al., 2015).

Для ответа на вопрос, какой цитогенетический механизм привел к формированию гибридной стерильности в этом случае, мы использовали самцов и самок гибридов между *P. sungorus* и *P. campbelli*.

Было показано, что у гибридов *P. campbelli* х *P. sungorus* наблюдается асимметрия скрещивания, так как гибриды самки *P. sungorus* и самца *P. campbelli* гибнут еще до рождения (Brekke et al., 2016). Известно, что гибриды от самки *P. campbelli* и самца *P. sungorus* жизнеспособны, при этом гибридные самцы стерильны, а самки фертильны (Ishishita et al., 2015).

3.1 Гистологический анализ гибридов рода *Phodopus*

Для определения спектра нарушений сперматогенеза у гибридов *P. campbelli* х *P. sungorus* Е.А. Кизиловой был проведен гистологический анализ динамики сперматогенеза у родительских видов (Рис. 14А) и гибридов (Рис. 14Б-В). У всех гибридов наблюдались множественные aberrации в морфологии семенных канальцев и их содержимого. Во многих канальцах просвет был расширенный либо пустой, цикл сперматогенного эпителия был нарушен (Рис. 14Б-В). В просвете канальцев не было нормально созревающих или зрелых сперматозоидов.

По стадиям остановки сперматогенеза гибриды были разделены на группы А и Б. Канальцы гибридов типа А практически не содержали сперматогенного эпителия: в стенках канальцев были только многочисленные клетки Сертоли и редкие сперматогонии (Рис. 13Б). У гибридов типа Б наблюдались редкие сперматиды и единичные сперматозоиды аномальной морфологии, сперматогенный эпителий канальцев был обеднен (Рис. 14В). В дальнейший цитогенетический анализ мейоцитов вошли только гибриды типа Б.

Отношение сперматид к сперматоцитам I было значительно снижено у гибридов типа Б и отличалось от родительских видов и от ожидаемого 4:1 (0.2 ± 0.1 , попарный критерий Вилкоксона, $P = 2 \cdot 10^{-16}$). При этом в канальце накапливались сперматоциты на поздних стадиях профазы I.

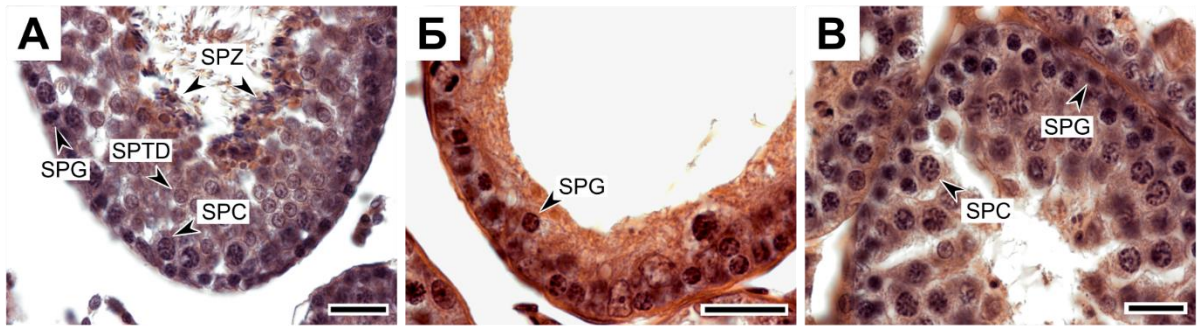


Рисунок 14. Гистологические срезы семенных канальцев *Phodopus campbelli* (А) и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus* типа А (Б) и типа В (В), окрашенных гематоксилин-эозином. SPG, сперматогонии; SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм. Исходные фотографии были любезно предоставлены Е.А. Кизиловой.

3.2 Цитогенетический анализ гибридов рода *Phodopus*

С помощью гистологического анализа срезов семенных канальцев, находящихся на разных этапах сперматогенеза мы показали, что у гибридов происходит остановка мейоза и накопление сперматоцитов первого порядка в конце профазы I (Рис. 14). На этой стадии происходит два основных процесса мейоза – синапсис и рекомбинация, нарушения которых могут приводить к апоптотической гибели гамет. Мы исследовали синапсис и рекомбинацию аутосом и полового бивалента на стадии пахитены у стерильных самцов и фертильных самок гибридов *P. campbelli* и *P. sungorus* и у родительских видов. Для этого мы использовали иммунолокализацию ключевых белков мейоза: SYCP3, SYCP1, MLH1 и γ H2A.X. Половой бивалент у самок был идентифицирован с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с гибридизационной пробой к X-хромосоме *M. auratus*.

3.2.1 Синапсис и рекомбинация аутосом

В клетках на стадии средней-поздней пахитены гомологичные аутосомы у родительских видов и у гибридов синаптированы по всей длине, у длинных хромосом практически каждое хромосомное плечо несет 1-2 сайта MLH1, для коротких хромосом характерно наличие одного обмена (Рис. 15). Негомологичные ассоциации и интерлокинг хромосом или зацепление негомологичных хромосом были крайне редки (Рис. 15, Рис. 16; Таблица 5). Отмечена индивидуальная вариация числа сигналов MLH1 как у самцов, так и у самок родительских видов (Н-критерий Крускала-Уоллиса, $P < 0,01$). Самцы и самки гибридов были достаточно однородны по этому признаку ($P > 0,05$). Мы не наблюдали значимых различий по числу сайтов MLH1 на клетку между гибридами и родительскими видами (t-критерий Стьюдента, $P > 0,05$) (Рис. 17; Таблица 5). Это указывает на то, что рекомбинация аутосом не была нарушена у гибридов обоих полов.

Мы оценили рекомбинационные характеристики у четырех выбранных аутосомных бивалентов, которые были однозначно идентифицированы по их длине и центромерному индексу (Рис. 18). При сравнении бивалентов выявлены достоверные половые различия в их длине (t-критерий Стьюдента после поправки Бонферрони на множественные сравнения, $P < 10^{-5}$) и слабые половые различия в числе сигналов MLH1 внутри каждой группы ($P > 0,004$). Гибриды обоих полов показали слабые отличия от родительских видов по числу сигналов MLH1 по каждому из выбранных бивалентов ($P > 0,003$).

Таблица 5. Цитогенетические характеристики сперматоцитов *Phodopus sungorus* (PSU), *P. campbelli* (PCA) и их F1 гибридов. Данные приведены в виде среднее±стандартное отклонение в случае числа MLH1 на клетку и среднее±стандартная ошибка среднего в случае представления доли клеток с интерлокингом (зацеплением негомологичных хромосом).

Самки	Самцы	Пол	2n	FN	Число животных	Число клеток	Число MLH1 на клетку	Частота интерлокинга
Родительские виды								
PSU	PSU	♂	28	54	3	119	19.3±2.9	0.2±0.2%
PSU	PSU	♀	28	55	3	119	19.2±2.2	0.3±0.3%
PCA	PCA	♂	28	54	3	89	19.2±2.5	0%
PCA	PCA	♀	28	55	3	151	18.5±3.6	2.5±0.8%
Межвидовые гибриды								
PCA	PSU	♂	28	54	2	86	19.7±2.4	0.5±0.4%
PCA	PSU	♀	28	55	4	177	17.9±3.6	3.1±0.9%

Паттерны распределения MLH1 у гибридов и родительских видов были аналогичны описанным для других млекопитающих (Segura et al., 2013; Capilla et al., 2016). Так, частота сигналов MLH1 была высокой вблизи дистальных концов хромосом и низкой около центромерных районов. Распределение сайтов кроссинговера вдоль бивалентов было более равномерным в ооцитах, в сравнении со сперматоцитами (Рис. 18). Мы обнаружили достоверные различия между родительскими видами и гибридами F1 того же пола в распределении сигналов MLH1 вдоль одних и тех же бивалентов (критерий Колмогорова-Смирнова, $P < 0,004$).

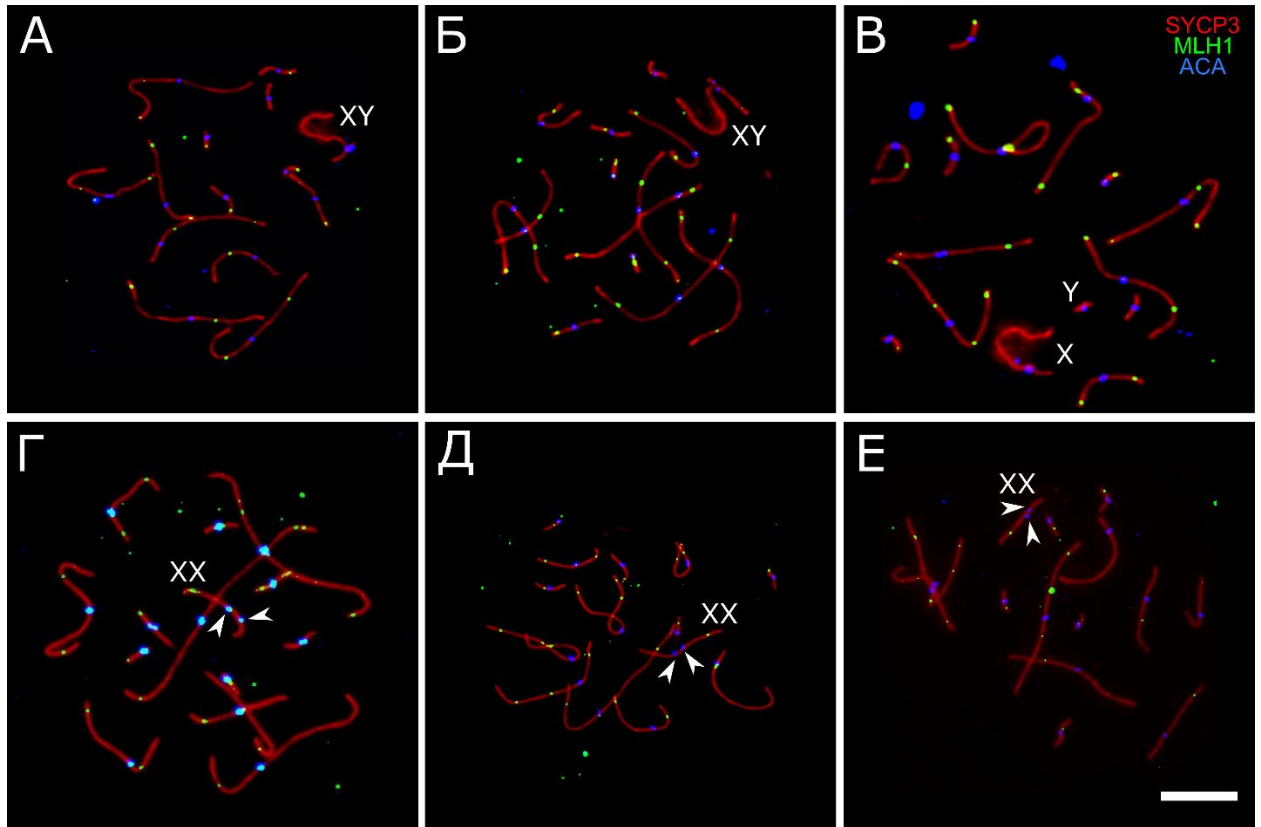


Рисунок 15. Пахитенные сперматоциты (А–В) и ооциты (Г–Е) *P. sungorus* (А, Г), *P. campbelli* (Б, Д) и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus* (В, Е). Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. Стрелками показаны неспаренные центромеры XX бивалента. Масштаб – 10 мкм.

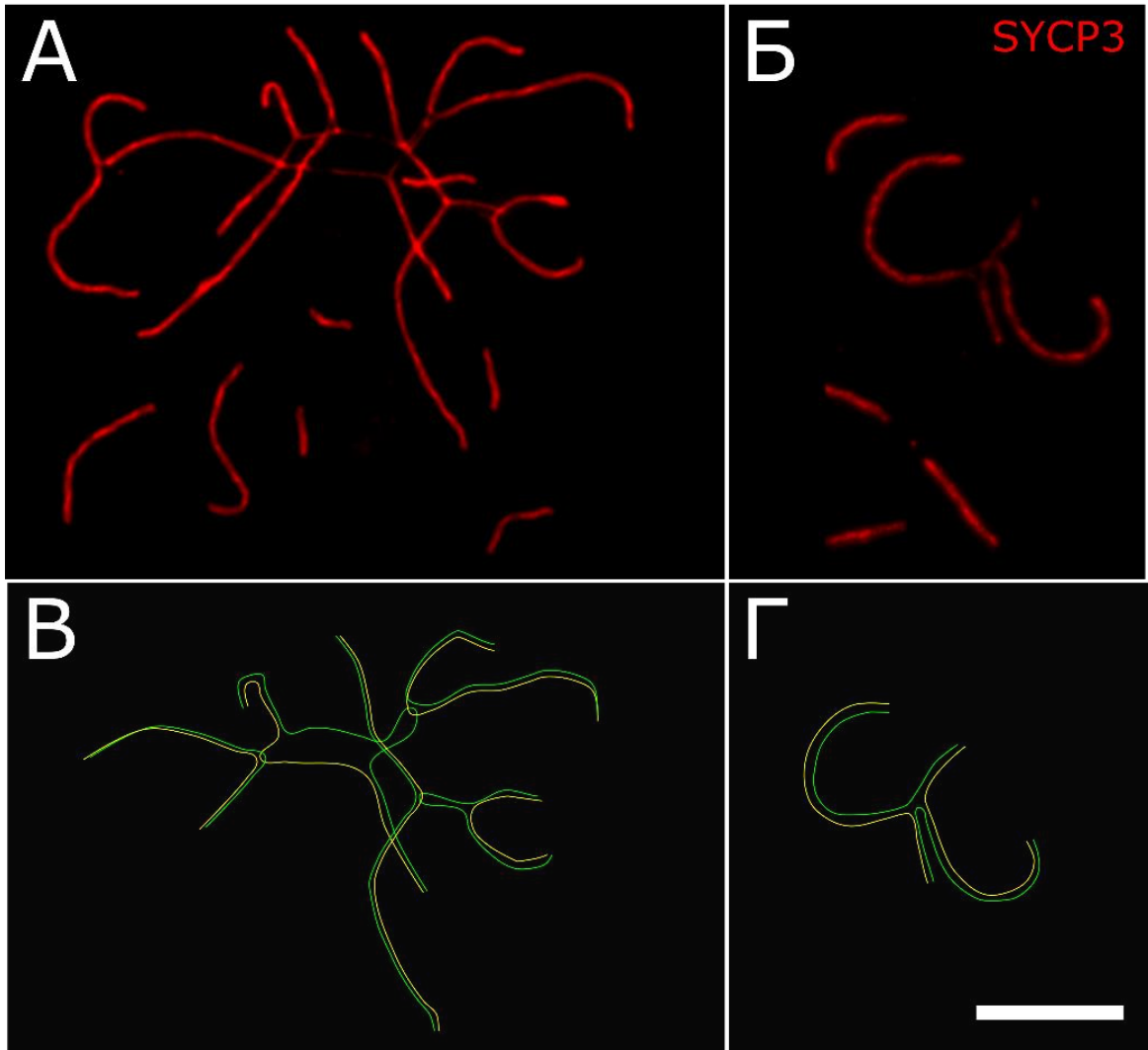


Рисунок 16. Фрагмент пахитенного ооцита *P. campbelli*, иллюстрирующий интерлокинг (А) и гибрида F1 *P. campbelli* x *P. sungorus*, иллюстрирующий негомологичный синапсис аутосом (Б) и соответствующие схематичные изображения СК (В, Г). Красный – SYCP3. Масштаб – 10 мкм.

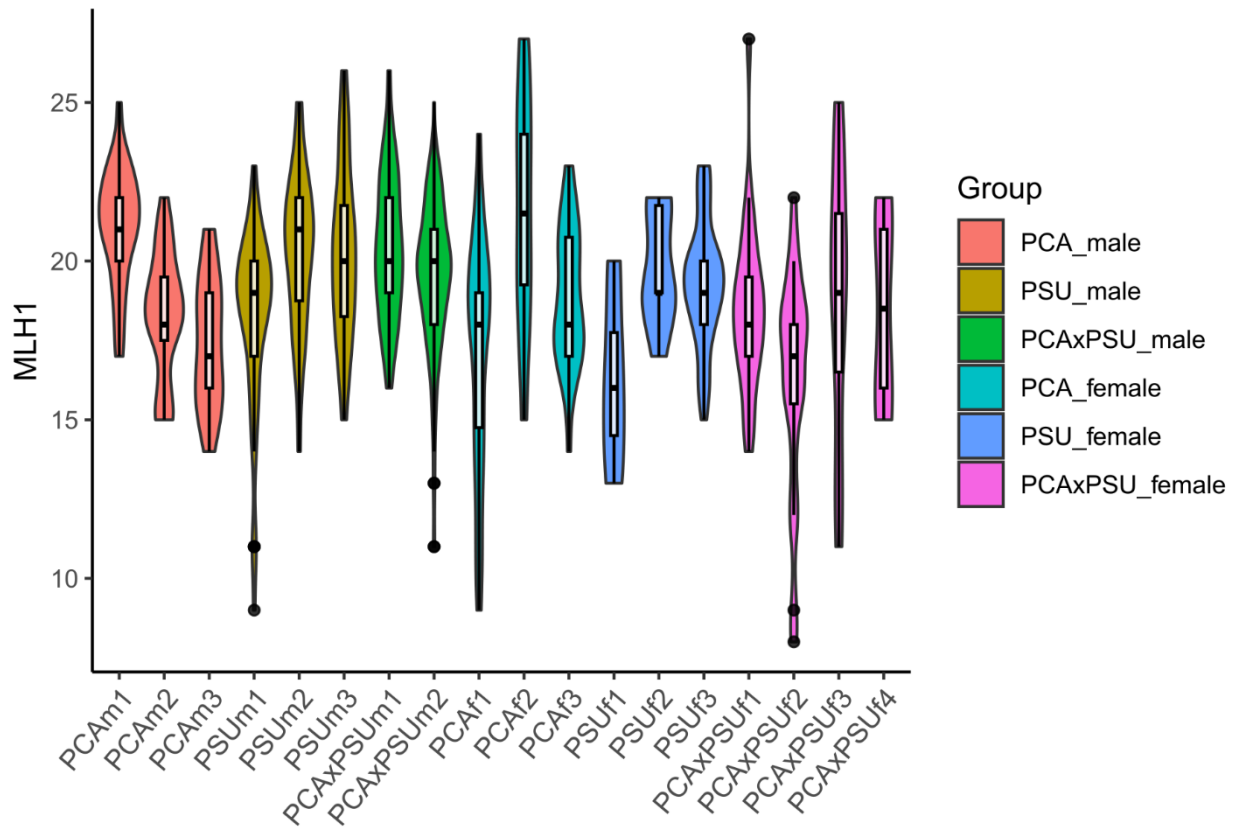


Рисунок 17. Число сигналов MLH1 на клетку для каждой особи *P. campbelli* (PCA) *P. sungorus* (PSU) и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus* (PCAxPSU) самок (female, f) и самцов (male, m), представленное в виде графика «скрипки» с диаграммой размаха. Генотипические группы обозначены одним цветом.

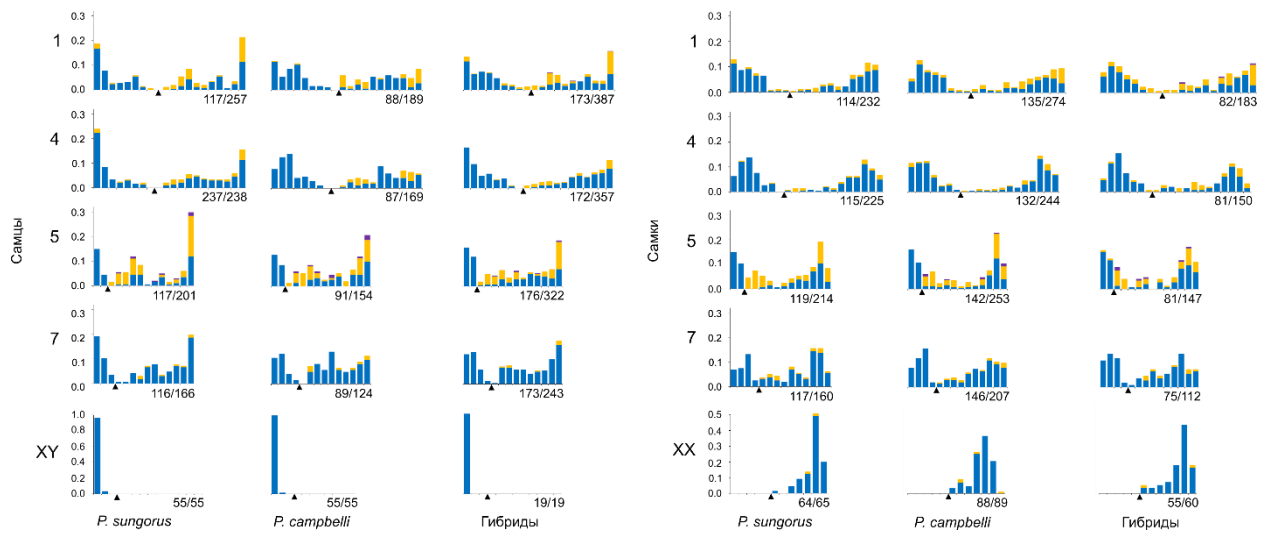


Рисунок 18. Распределение сигналов MLN1 по бивалентам 1, 4, 5, 7 и половому биваленту в пахитенных сперматоцитах и ооцитах *P. sungorus*, *P. campbelli* и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus*. Номер бивалента указан слева от гистограммы распределения. Черный треугольник показывает положение центромеры для каждого графика. Ось X показывает положение сигналов MLN1 на биваленте, каждое деление соответствует примерно 1 мкм длины СК. Столбцы гистограммы показывают частоту бивалентов, содержащих один (синий), два (желтый) или три (фиолетовый) сигнала MLN1 в каждом интервале длины. Цифры под каждым графиком обозначают число проанализированных хромосом/сигналов MLN1.

3.2.2 Синапсис и рекомбинация полового бивалента XY

Различия в синапсисе и рекомбинации половых хромосом у самцов между родительскими видами и гибридами были более выраженными (Рис. 15). Большинство пахитенных клеток *P. sungorus* и *P. campbelli* содержали частично или полностью синаптированный XY бивалент (Рис. 15А, Б, Рис. 19А; Таблица 6). В норме в синапсис вовлекаются дистальный участок короткого плеча X (Xp) и длинного плеча Y (Yq). Синапсис начинается с концов бивалента и продолжается по всей длине Y-хромосомы (Рис. 20). В некоторых клетках плечо Yp было полностью синаптировано с проксимальной частью Xq. Дистальная часть Xq оставалась асинаптированной и демонстрировала сильный сигнал γ H2A.X, в то время как в области синапсиса сигнал отсутствовал (Рис. 21А).

Таблица 6. Относительная частота нарушений синапсиса половых хромосом у самцов *P. sungorus*, *P. campbelli* и их F1 гибридов на стадии средней-поздней пахитены. Число животных совпадает с таковым в Таблице 4. Данные приведены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$.

Группа	Характеристика синапсиса XY			
	Число клеток	Асинаптирован	Синаптирован, нет MLH1	Синаптирован, есть MLH1
<i>P. sungorus</i>	191	0.11 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04	0.53 \pm 0.04
<i>P. campbelli</i>	152	0.09 \pm 0.02	0.26 \pm 0.04	0.65 \pm 0.04
F1	213	0.78 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02

У гибридов большинство пахитенных сперматоцитов содержали синаптированные только дистальными концами (Рис. 19Б) или полностью асинаптированные половые хромосомы (Рис. 15В, Рис. 19В, Г, Рис. 21Б, Д). В некоторых клетках асинаптированная Y-хромосома образовывала шпильку (Рис. 19Г). На асинаптированных половых хромосомах сигнал γ H2A.X был равномерно распределен по всей длине, что, вероятно, свидетельствует об их полной транскрипционной инактивации (Рис. 21Б, Д). Из всех клеток с асинаптированными X и Y в 80% клеток половые хромосомы располагались рядом друг с другом в общем облаке γ H2A.X (Рис. 21Б, Д), в оставшихся 20% клеток они находились на расстоянии друг от друга (Рис. 19В, Г).

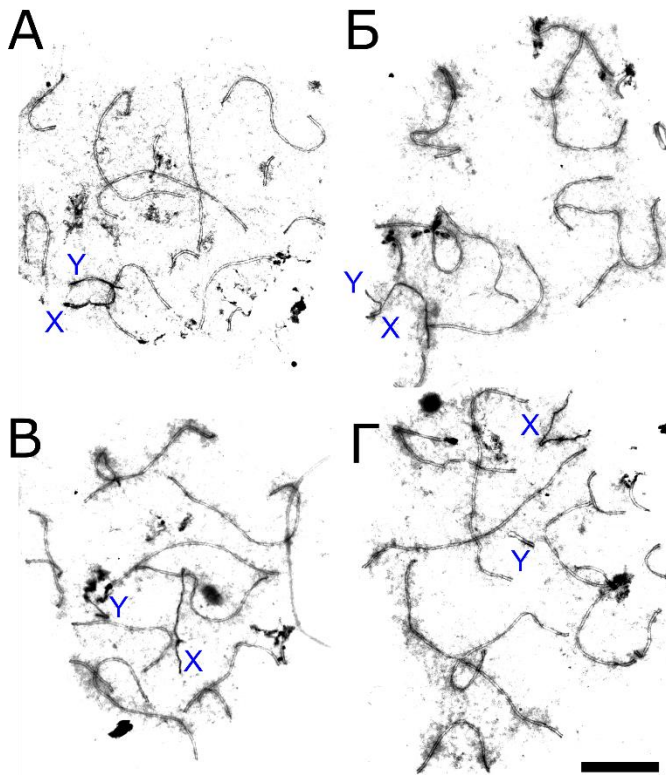


Рисунок 19. Пахитенные сперматоциты *P. sungorus* (А) и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus* (Б–Г) после окрашивания нитратом серебра, выявленные с помощью метода электронной микроскопии. Буквами обозначены половые хромосомы. (А) полный синاپсис между Xp и Yq; (Б) синাপсис между невыровненными концами Xp и Yq; (В) асинাপсис X и Y; (Г) асинাপсис X и Y, где Y синাপтирует сама на себя негомологичным образом, образуя шпильку. Масштаб – 10 мкм.

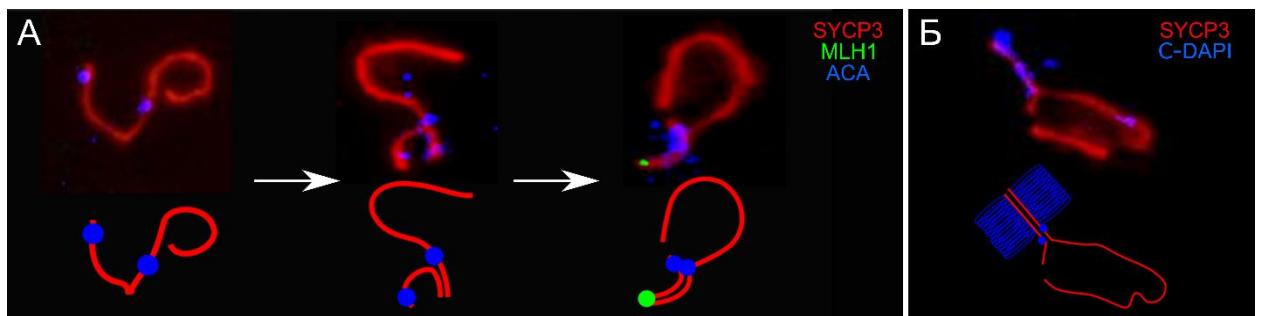


Рисунок 20. Морфология полового бивалента XY в сперматоцитах *P. sungorus* на стадии пахитены (верхний ряд) и соответствующие схематичные изображения СК (нижний ряд). (А) динамика синাপсиса XY. Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. (Б) морфология XY бивалента после С-подобного окрашивания DAPI для выявления С-конститутивного гетерохроматина. Красный – SYCP3, синий – DAPI.

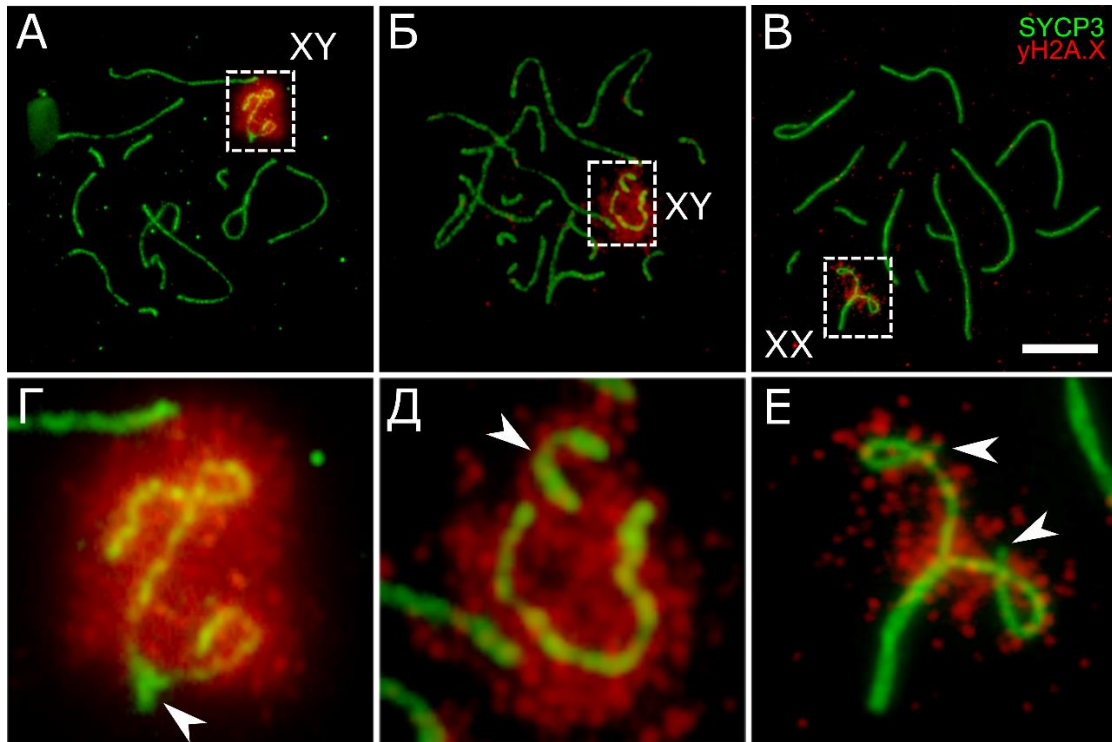


Рисунок 21. Пахитенные сперматоциты (А, Б) и ооцит (В) *P. sungorus* (А) и гибридов F1 *P. campbelli* x *P. sungorus* (Б, В). Красный – γ H2A.X, зеленый – SYCP3. Нижний ряд (Г–Е) демонстрирует увеличенное изображение белых пунктирных рамок верхнего ряда. (А, Г) синаптированный половой бивалент XY, асинаптированная часть хромосом покрыта облаком γ H2A.X. Стрелка обозначает район синапсиса, свободный от γ H2A.X; (Б, Д) расположенные рядом X- и Y-хромосомы в едином облаке γ H2A.X. Стрелка обозначает Y-хромосому; (В, Е) XX бивалент, в котором асинаптированы Xp. Стрелки обозначают дистальные концы асинаптированных плечей. Масштаб – 10 мкм.

MLH1 всегда располагался в псевдоаутосомном районе (ПАР), расположенном в узком прителомерном районе Xp и Yq (Рис. 20А). Размер ПАР оценивался как относительное расстояние между концом Xp (Yq) и самым дальним сигналом MLH1 и составлял около 10% от Xp или около 1 мкм во всех трех группах, несмотря на то, что в норме синаптированный участок составлял целиком длинное плечо акроцентрической Y-хромосомы (Рис. 20). Известно, что синаптированный участок бивалента у обоих родительских видов имеет гетерохроматиновую природу (Vistorin et al., 1977; O'Brien et al., 2006). Небольшой размер ПАР при наличии протяженного района синапсиса у полового бивалента может свидетельствовать об эффективной синаптической подгонке данного участка с помощью негомологичного синапсиса гетерохроматиновых плечей (Рис. 20Б).

Мы наблюдали достоверное различие между родительскими видами и гибридами по частоте асинапсиса XY (Однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-4}$). У родительских видов больше половины бивалентов XY содержало поздний рекомбинационный узелок, тогда как у гибридов лишь 10% половых хромосом демонстрировало сигнал MLH1 (Таблица 6). Различия в частоте таких бивалентов достоверны как между родительскими видами и гибридами, так и между *P. campbelli* и *P. sungorus* (Однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-16}$ и $P < 0.03$ соответственно). Пониженная частота выявления сайта MLH1 в ПАР родительских видов может быть связана с асинхронностью формирования рекомбинационных узелков в ходе профазы I (Carpenter, 1979).

Однако если принять во внимание только синаптированные половые биваленты, то мы нивелируем различия в частоте синапсиса половых хромосом между родительскими видами и гибридами и сфокусируемся только на особенностях рекомбинации ПАР. У самцов гибридов сигнал MLH1 локализовался в прителомерном районе Xp и Yq в $44,7 \pm 7,3\%$ половых бивалентов, синапсис которых был начат или почти полностью завершен (плечо Xp синаптировало полностью), по сравнению с $71,2 \pm 3,8\%$ у самцов *P. campbelli* и $57,3 \pm 3,8\%$ у самцов *P. sungorus*. Снижение частоты рекомбинации у гибридов без учета повышенной вероятности асинапсиса полового бивалента по сравнению с родительскими видами может быть следствием задержки репарации двунитевых разрывов в ПАР.

3.2.3 Синапсис и рекомбинация полового бивалента XX

Значительная часть ооцитов и у родительских видов, и у гибридов содержала половой бивалент XX с невыровненными центромерами и неспаренными теломерными концами короткого плеча (Рис. 15Г-Е, Рис. 21А; Таблица 7). Так как подобные биваленты отсутствовали в сперматоцитах, мы предположили, что это половой бивалент XX.

Предположение было подтверждено с помощью FISH с зондом X-хромосомы золотистого хомячка *Mesocricetus auratus* (Romanenko et al., 2006). Зонд давал сильный специфический сигнал на Xq, в то время как гетерохроматиновое плечо Xp (Рис. 22Б) оставалось неокрашенным (Рис. 23). Наибольшее число клеток с невыровненными центромерами у XX было у гибридов (Таблица 7). Различие между гибридами и обоими родительскими видами было достоверным (Однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-7}$).

Таблица 7. Относительная частота нарушений синапсиса половых хромосом у самок на стадии средней-поздней пахитены у *Phodopus sungorus*, *P. campbelli* и их F1 гибридов. Число животных совпадает с таковым в Таблице 4. Данные приведены в виде среднее±стандартная ошибка среднего.

Группа	Характеристика синапсиса XX		
	Число клеток	Центромеры невыровнены	Асинапсис Xp
<i>P. sungorus</i>	151	0.52±0.04	0.12±0.02
<i>P. campbelli</i>	321	0.37±0.03	0.10±0.02
F1	162	0.70±0.04	0.62±0.04

Рисунок 22А показывает динамику синапсиса полового бивалента у самок карликовых хомячков рода *Phodopus*. Синапсис длинного плеча X-хромосомы часто был уже завершен, в то время как прицентромерная часть была синаптирована, но не выровнена, а у дистального конца короткого плеча бивалента не были завершены ни синапсис, ни синаптическая подгонка. Мы предполагаем, что большой гетерохроматиновый блок на коротком плече X-хромосомы замедлял синапсис этого района, однако часть бивалентов, у которых центромеры были выровнены, быстрее проходила синаптическую подгонку. Помимо этого, мы могли наблюдать ооциты на разных стадиях пахитены, что объясняет, почему не во всех клетках центромеры были невыровненными.

Некоторые биваленты XX с невыровненными центромерами демонстрировали частичный или полный асинапсис дистальных концов Xp. Неспаренные участки были помечены антителами γ H2A.X (Рис. 21В, Е). Эта абберрация была довольно частой среди исследуемых особей и затрагивала большую часть пахитенных ооцитов у гибридов (Таблица 7). Различие между гибридами и родительскими видами было достоверным (Однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-16}$).

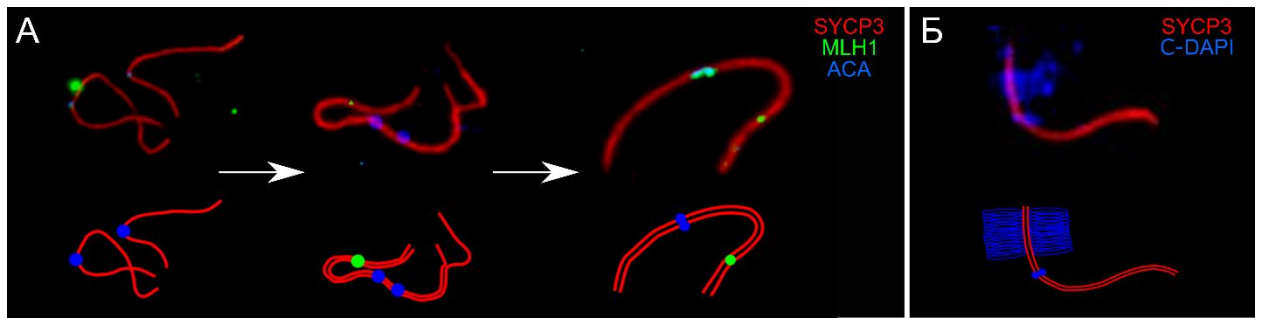


Рисунок 22. Морфология полового бивалента XX в ооцитах *P. sungorus* на стадии пахитены (верхний ряд) и соответствующие схематичные изображения СК (нижний ряд). (А) динамика синапсиса XX. Красный – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромерные белки. (Б) морфология XX бивалента после С-подобного окрашивания DAPI для выявления С-конститутивного гетерохроматина. Красный – SYCP3, синий – DAPI.

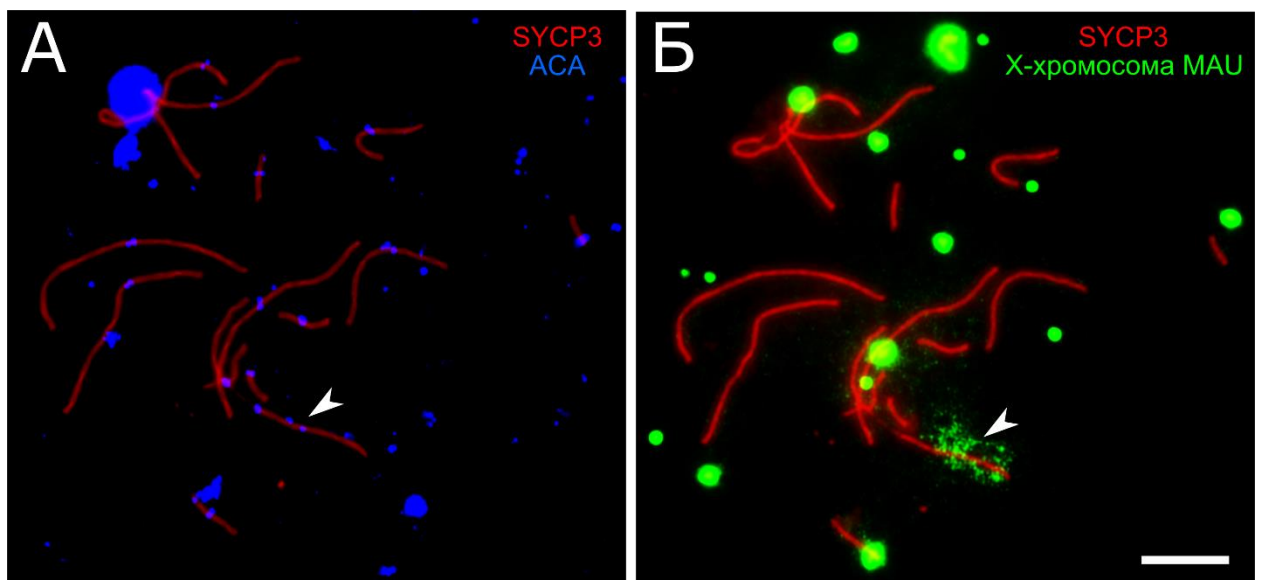


Рисунок 23. Ооцит *P. campbelli* на стадии пахитены после иммуноокрашивания (слева) и последующей гибридизации (справа). Красный – SYCP3, синий – центромерные белки, зеленый – проба к X-хромосоме *M. auratus* (MAU). Стрелками показан половой бивалент XX. Масштаб: 10 мкм.

Мы не наблюдали сигналы MLH1 на гетерохроматиновом плече Xp. Одиночные сигналы MLH1 были обнаружены только на Xq (Рис. 15Г-Е, Рис. 18, Рис. 22А). У некоторых бивалентов XX отсутствовали сигналы MLH1 на обоих плечах. Паттерн распределения сигналов MLH1 вдоль Xq был похож на наблюдаемый на плечах метацентрических аутосом карликовых хомячков с пиком вблизи теломеры и провалом вблизи центромеры (Рис. 18). Поскольку XX биваленты с неспаренными теломерными концами и невыровненными центромерами встречались в клетках с полностью синаптированными аутосомами (Рис. 21В), мы предполагаем, что синапсис полового бивалента был задержан. Эта задержка была сильнее выражена у гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* в сравнении с родительскими видами.

Таким образом, мы не обнаружили нарушений в синапсисе и рекомбинации аутосом как у самок, так и у самцов гибридов близкородственных видов мохноногих хомячков *P. campbelli* и *P. sungorus*, кариотипы родительских видов которых практически полностью идентичны, а время дивергенции родительских видов около 1 млн лет. Однако наличие большого гетерохроматинового блока в коротком плече X хромосомы, возможно, вызывает задержку синапсиса полового бивалента у гибридов обоих полов и препятствует рекомбинации в этом районе у самок. Это может быть причиной высокой частоты асинапсиса полового бивалента у самцов и, как следствие, гибридной стерильности у *P. campbelli* и *P. sungorus*.

ОБСУЖДЕНИЕ

1 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Alexandromys*

1.1 Межвидовые гибриды стерильны, тогда как внутривидовые гибриды демонстрируют показатели сперматогенеза, сравнимые с родительскими видами

С помощью гистологического анализа гонад мы показали, что гибриды между тремя близкородственными видами (Bannikova et al., 2010; Lisovsky et al., 2018) с сильной кариотипической дивергенцией *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* и *A. evoronensis* стерильны. Это хорошо согласуется с результатами, полученными Мейер с соавт. (1996). Авторы показали отсутствие фертильности у межвидовых гибридов на фоне остановки сперматогенеза, в основном, на стадии сперматоцитов. Согласно нашим данным, гибридная стерильность у самцов – это следствие аномалий развития сперматоцитов и сперматид, которые приводят к нарушению сперматогенеза. Однако у представителей родительских

видов, а также у гибридов между географически изолированными популяциями и хромосомными расами *A. evoronensis*, кариотипы которых отличаются друг от друга серией хромосомных перестроек, сперматогенез протекает нормально (Таблица 8), что говорит об их потенциальной фертильности. Из этого следует вопрос: какова цитологическая основа различий в фертильности между внутри- и межвидовыми гибридами?

1.2 Асинапсис является основной причиной мейотического ареста и, как следствие, стерильности у межвидовых гибридов

Согласно результатам проведенного нами цитогенетического анализа основной причиной остановки мейоза, а, следовательно, и стерильности у межвидовых гибридов группы «*maximowiczii*» является асинапсис гомеологичных хромосом, который мы визуализировали с помощью иммунолокализации белков латерального и центрального элементов СК (Рис. 5) и с помощью электронной микроскопии СК (Рис. 9).

Ранее для нескольких видов млекопитающих было показано, что асинапсис гомологичных хромосом приводит к накоплению нерепарированных промежуточных рекомбинационных соединений, а неспаренные участки хромосом подвергаются транскрипционному сайленсингу (Turner et al., 2005; Turner, 2015). Клетка, в которой подавляется экспрессия генов, потенциально необходимых для мейотической прогрессии сперматоцитов, не проходит точку контроля пахитены, что приводит к остановке мейоза (Burgoyne et al., 2009; Turner, 2015) и апоптотической гибели клетки (Odorisio et al., 1998; Cloutier and Turner, 2010).

У гибридов между *A. maximowiczii*, *A. mujanensis* и *A. evoronensis* присутствовали все вышеописанные последствия множественного асинапсиса гомологичных хромосом: накопление нерепарированных двунитевых разрывов ДНК, мейотический сайленсинг неспаренного хроматина, маркируемый антителами к γ H2A.X (Рис. 5И, М, П), апоптоз первичных сперматоцитов, маркируемых с помощью TUNEL (Рис. 3Е, 3, К, М) и различные постмейотические нарушения, такие как аномальная морфология сперматид и сперматозоидов (Рис. 3Д, Ж; Таблица 8) и уменьшение их пула в канальцах.

Таблица 8. Нарушения сперматогенеза у *A. maximowiczii* (MAX), *A. mujanensis* (MUJ), *A. evoronensis* «Арги» (EVA), *A. evoronensis* «Эворон» (EVE) и их внутри- и межвидовых гибридов. Число самцов, вошедших в анализ, совпадает с данным в Таблице 2.

Самки	Самцы	Последняя детектируемая стадия гаметогенеза	Гаметогенез	Мейотическая профза I
<i>Родительские виды</i>				
MAX	MAX	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
MUJ	MUJ	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
EVA	EVA	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
EVE	EVE	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
EVA	EVA	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
<i>Межпопуляционные гибриды и гибриды между хромосомными расами</i>				
EVA-2	EVA-1	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
EVA-2	EVE	Сперматозоиды или сперматоциты I	Без нарушений или замедленный сперматогенез	Без нарушений
<i>Межвидовые гибриды</i>				
MUJ	MAX	Сперматозоиды	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, сперматозоиды с аномалиями	Асинапсис аутосом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты, сложные мультиваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. Число поздних рекомбинационных узелков не снижено
EVA	MUJ	Сперматозоиды	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, сперматозоиды с аномалиями	Асинапсис аутосом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты, сложные мультиваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. Единичные поздние рекомбинационные узелки
MUJ	EVA	Сперматозоиды	Остановка мейоза на пахитено-подобной стадии	Асинапсис аутосом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты, сложные мультиваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. Поздних рекомбинационных узелков нет
MAX	EVE	Сперматоциты I	Остановка мейоза на пахитено-подобной стадии	Асинапсис аутосом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты, сложные мультиваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. Поздних рекомбинационных узелков нет
EVA	MAX	Сперматоциты I	Остановка мейоза преимущественно на зиготено-подобной стадии	Асинапсис аутосом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты, сложные мультиваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. Единичные поздние рекомбинационные узелки

1.3 У межвидовых гибридов асинопсис гомологичных хромосом обусловлен сложной гетерозиготностью по серии хромосомных перестроек

Все межвидовые гибриды группы «*maximowiczii*» были сложными гетерозиготами по ряду альтернативных слияний хромосом с монобрахиальной гомологией. Слияния различных акроцентрических хромосом в разных сочетаниях (Робертсоновские или тандемные) закрепились или остались в полиморфном состоянии у родительских видов. В результате гомологичного синапсиса таких хромосом у гибридов должны образовываться длинные хромосомные цепи (до 21 элемента). В прицентромерных областях синапсис был затруднен из-за топологических ограничений, что приводит к фрагментации ожидаемой длинной цепи хромосом на несколько более коротких незамкнутых цепей и/или униваленты (Рис. 5Ж-П, Рис. 9). Сложная гетерозиготность по перичентрическим инверсиям и центромерным сдвигам в хромосомных элементах цепей усложняла поиск гомологии, что усиливало задержку синапсиса. Различия в сложности синаптической конфигурации определяли различия в выраженности мейотических aberrаций между разными скрещиваниями межвидовых гибридов и между гибридами одних и тех же скрещиваний.

Асинопсис является основной, но не единственной причиной гибридной стерильности у исследуемых полевых рода *Alexandromys*. Формирование сложных синаптических конфигураций может приводить к нерасхождению хромосом в небольшом числе сперматоцитов, которые успешно прогрессировали до стадии метафазы I, и, следовательно, образованию несбалансированных гамет. Мейер и соавт. (1996) детектировали сложные поливалентные цепи на стадии метафазы I у самцов гибридов *A. mujanensis* × *A. maximowiczii*. Это также согласуется с результатами исследований влияния простой и сложной гетерозиготности по ряду Робертсоновских транслокаций на мейотическое поведение хромосом и фертильность у диких и лабораторных мышей (Redi et al., 1985; de Boer et al., 1986; Hauffe and Searle, 1998; Garagna et al., 2001, 2014; Merico et al., 2003; Medarde et al., 2015; Förster et al., 2016; Ribagorda et al., 2019).

1.4 Влияние хромосомных перестроек на синапсис и рекомбинацию хромосом у внутривидовых гибридов *A. evoronensis*.

Мы наблюдали нормальный синапсис и рекомбинацию хромосом на стадии средней-поздней пахитены у представителей родительских видов *A. maximowiczii*, *A. mujanensis*, *A. evoronensis* «Арги» и *A. evoronensis* «Эворон» и у межпопуляционных и межрасовых гибридов *A. evoronensis* (Рис. 5Г-Е, Рис. 7). Таким образом, гетерозиготность по одной или нескольким (до девяти) хромосомным перестройкам (инверсиям, сдвигам центромер,

Робертсоновским или тандемным транслокациям, которые не накладываются друг на друга) не оказывает негативного влияния на прохождение мейоза у полевок группы «*taximowiczii*» и, вероятно, не влияет на фертильность носителей, что согласуется с известными литературными данными. У видов, для которых был описан хромосомный полиморфизм: туко-туко (Lanzone et al., 2007; Basheva et al., 2014b), обыкновенная бурозубка (Wallace et al., 2002; Borodin et al., 2019) и землеройка (Matveevsky et al., 2023), было продемонстрировано незначительное влияние простой гетерозиготности по одному или нескольким хромосомным слияниям на синапсис хромосом.

Некоторое количество инверсий, по которым наблюдался внутри- и межпопуляционный полиморфизм, достоверно не снизило уровень рекомбинации у внутривидовых гибридов *A. evoronensis* и межвидовых гибридов *A. mujanensis* × *A. taximowiczii*. Вероятно, это может быть связано с тем, что уровень рекомбинации у исследованных видов и других описанных ранее видов рода *Microtus* (Borodin et al., 2010; Torgasheva and Borodin, 2016) поддерживается на минимальном уровне: в среднем одна хиазма на хромосому. Асинапсис и мейотический арест у других межвидовых гибридов полевок приводили к практически полному подавлению рекомбинации (Таблица 8).

Для большинства половых клеток гетерозигот по перицентрическим инверсиям характерен негомологичный синапсис инвертированных районов. У многих видов описана синаптическая подгонка в инверсионных петлях, когда происходит эффективное выравнивание гомологов относительно друг друга (Moses et al., 1982; Borodin et al., 1990; Torgasheva and Borodin, 2010; Torgasheva et al., 2013). Из этого следует, что простая гетерозиготность по одной или нескольким инверсиям или сдвигам центромер не вызывает остановки мейоза и не влияет на уровень рекомбинации у носителей.

Запирание рекомбинации в точках разрыва перестроек и в инвертированных районах влияет на уменьшение потока генов между популяциями и сохраняет адапционные блоки генов. Это было показано на серии различных примеров, в том числе на примере хромосомного видообразования в ситуации симпатрии бабочек *Brenthis*, кариотипы видов которых различались серией хромосомных слияний (Mackintosh et al., 2022). Вероятно, недавняя и неполная изоляция популяций привела к тому, что немногие перестройки успели закрепиться в конкретных хромосомных расах и их влияние на рекомбинационный ландшафт оказалось незначительно.

Возможное подавление рекомбинации в районах границ перестроек может способствовать видообразованию у рассмотренных полевок рода *Alexandromys*. Однако

стерильность гибридов подавляет поток генов между видами более эффективно, чем ограничение уровня рекомбинации.

1.5 Хромосомный полиморфизм у видов группы «*maximowiczii*», по-видимому, нейтрален

Мы выявили, что простая гетерозиготность по нескольким хромосомным перестройкам в случае полевок группы «*maximowiczii*» не нарушает синапсис хромосом и прогрессию мейоза у носителей. Это указывает на то, что отбор против хромосомных гетерозигот маловероятен. Подавление рекомбинации у простых гетерозигот по инверсиям, центромерным сдвигам и слияниям хромосом может приводить к нарушению равновесия по сцеплению между аллелями, расположенными в точках разрыва. Такие блоки сцепленных аллелей (супергены) были обнаружены у нескольких видов растений и животных (Schwander et al., 2014). Однако маловероятно, что небольшие изменения в паттернах рекомбинации у простых гетерозигот играют важную роль в стабильном поддержании хромосомного полиморфизма у исследуемых видов. Подобное предположение потребовало бы наличие повышенной приспособленности у гетерозигот по перестройкам.

Более правдоподобным объяснением существования хромосомного полиморфизма является географическое подразделение популяций внутри каждого из видов группы «*maximowiczii*». Известно, что ареал обитания *A. maximowiczii* имеет относительно широкое мозаичное распространение (Kryštufek and Shenbrot, 2022) и включает в себя не менее двадцати различных кариотипов (Kartavtseva et al., 2008). Ареал обитания *A. tujanensis* и *A. evoronensis*, вероятно, неоднороден и сильно недооценен. Каждая из трех изученных к настоящему времени локальных популяций *A. evoronensis* хромосомно полиморфна и отличается друг от друга как кариотипически, так и генетически (Kartavtseva et al., 2021b). Три локальные популяции *A. tujanensis* отличаются наличием разных инверсий (Lemskaya et al., 2015; Kartavtseva et al., 2019). Можно предположить, что каждый из видов представляет собой мозаику из небольших частично перекрывающихся, но кариотипически различных популяций. Такая популяционная структура характерна для нескольких родов грызунов: *Ctenomys*, *Ellobius*, *Spalax* и других (Nevo et al., 1994; Bakloushinskaya et al., 2012; Torgasheva et al., 2016). В этом случае хромосомные гетерозиготы, наблюдаемые у видов группы «*maximowiczii*», можно интерпретировать как результат недавней гибридизации между соседними локальными популяциями.

Спорадические контакты между негомологичными хромосомами в профазе I мейоза у межпопуляционных и межрасовых гибридов, гетерозиготных по нескольким хромосомным слияниям, могут индуцировать возникновение новых хромосомных перестроек, как предполагают Матвеевский с соавт. (2020). Это, в свою очередь, может способствовать существующей кариотипической межвидовой дивергенции, а следовательно – гибридной стерильности и видообразованию.

1.6 Кариотипическая дивергенция способствует видообразованию в группе видов «*maximowiczii*»

Анализ молекулярных часов предполагает, что группа видов, в которую входят *A. maximowiczii*, *A. mujanensis* и *A. evoronensis*, отделилась от остальной части видового комплекса *Alexandromys* около 110 тысяч лет назад (Bannikova et al., 2010, 2019). Однако они накопили довольно существенные кариотипические различия и достигли полной репродуктивной изоляции друг от друга (Meyer et al., 1996). Результаты проведенного нами цитологического анализа позволяют предположить, что кариотипическая дивергенция между родительскими видами является наиболее вероятной причиной гибридной стерильности самцов.

Интересно сравнить гибридную стерильность, возникшую между видами группы «*maximowiczii*» и между видами группы «*arvalis*», описанной ранее Торгашевой и Бородиным (2016). Эти две группы видов различаются как по времени видообразования, так и по степени и сложности кариотипической дивергенции. Время дивергенции видов *Microtus arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* группы «*arvalis*» вдвое больше, чем между тремя видами группы «*maximowiczii*»: около 200 тысяч лет. Их кариотипы различаются четырьмя тандемными слияниями, одной парацентрической и шестью перицентрическими инверсиями и от четырех до семи предполагаемыми транслокациями, поэтому их гибриды являются простыми гетерозиготами по 15-18 перестройкам. Ожидается, что в профазе I у таких гибридов будут образованы 4 тривалента и 11-14 гетероморфных бивалентов.

Авторы обнаружили, что у самцов гибридов *M. arvalis* x *M. rossiaemeridionalis* мейоз останавливался на стадии лептотены, а у самок гибридов достигал пахитены (Torgasheva and Borodin, 2016). У гибридов в большинстве ооцитов выявлялось много унивалентов и мультивалентов, состоящих из негомологичных хромосом с продолжительными участками асинопсиса, тогда как в некоторых ооцитах синапсис был практически полностью завершен. Значительная вариабельность между ооцитами в соотношении гомологично и негомологично спаренных участков была интерпретирована как свидетельство того, что

выбор между гомологичным и негомологичным синапсисом был случайным. Авторы предположили, что существенная дивергенция нуклеотидных последовательностей родительских видов препятствует поиску гомологии и своевременному устранению эктопических взаимодействий между негомологичными хромосомами в ходе профазы I у гибридов (Torgasheva and Borodin, 2016).

Похожая ситуация возникла у гибридов между другими видами группы «arvalis», которые были исследованы в данной работе. У гибридов между *M. kermanensis* и *M. transcaspicus*, кариотипы которых различаются 8 хромосомными перестройками (Mazurok et al., 2001), мейоз останавливался на стадии лептотены, все хромосомы были асинаптированы. Однако у гибридов между *M. arvalis* и *M. kermanensis*, кариотипы которых различаются по 14 хромосомным перестройкам (Mazurok et al., 2001), мейоз останавливался на стадии зиготены и часть хромосом синаптировала. Таким образом, значимой причиной нарушений синапсиса у гибридов между видами группы «arvalis», по-видимому, является генетическая дивергенция. Кариотипическая дивергенция играет скорее вспомогательную роль, влияет на скорость пресинаптического выравнивания гомологов и усложняет поиск гомологичных районов (Torgasheva and Borodin, 2016).

Напротив, у видов группы «maximowiczii» существенную роль в нарушении гомологичного синапсиса играет кариотипическая дивергенция. Большинство хромосом в среднестатистической клетке синаптировано, число унивалентов мало. Уровень рекомбинации у гибридов сопоставим с родительскими видами, что говорит о сохранении гомологии между нуклеотидными последовательностями *A. maximowiczii*, *A. mujanensis* и *A. evoronensis*. Таким образом, можно предположить, что накопление сложных хромосомных перестроек в небольших изолированных популяциях было основным механизмом видообразования в группе «maximowiczii».

2 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Microtus*

2.1 Степень нарушений сперматогенеза у гибридов возрастает с увеличением генетической дистанции между родительскими видами

Мы оценивали стерильность самцов гибридов в сравнении с родительскими видами с разным временем дивергенции по спектру аномалий сперматогенеза. В целом, степень нарушения сперматогенеза у гибридов возрастала с увеличением филогенетической дистанции между родительскими видами. В среднем, абберрации сперматогенеза были

менее выражены у гибридов между видами группы «*mystacinus*», чем у гибридов между видами группы «*mystacinus*» и более отдаленными видами: *M. arvalis* и *M. transcaspicus*.

Гибриды между *M. rossiaemerdionalis* и *M. mystacinus* прямого и обратного направлений скрещивания были единственной группой, для которой мы наблюдали асимметрию гибридной стерильности, ранее описанную для межвидовых гибридов мышей (Dzur-Gejdosova et al., 2012; Larson et al., 2016; Nishino et al., 2018) и лошадей (Chandley et al., 1975). Однако внутри отдельных скрещиваний мы выявили вариацию по выраженности нарушений сперматогенеза. Наибольшую изменчивость демонстрировала группа гибридов между *M. rossiaemerdionalis* и *M. kermanensis*. В нее вошли один самец с остановкой сперматогенеза на стадии сперматогоний, один самец, в канальцах которого находились зрелые аномальные сперматозоиды и пять самцов с промежуточными степенями нарушений сперматогенеза (Рис. 10В-Е; Таблица 9). Подобная гетерогенность наблюдалась у гибридов мохноногих хомячков (Ishishita et al., 2015) и у гибридов сумчатых, у которых стадии остановки сперматогенеза варьировали от сперматид до аномальных зрелых сперматозоидов (Close and Lowry, 1989).

Вероятно, причина наблюдаемой гетерогенности связана с большим числом генов (более тысячи), участвующих в контроле определенных стадий сперматогенеза. В развитии разных популяций клеток сперматогенного эпителия принимают участие многие регуляторные элементы, транскрипционные факторы и регуляторы состояния хроматина. Межвидовая генетическая несовместимость по этим локусам, вероятно, вызывает регуляторные отклонения в поддержании нормального прохождения сперматогенеза.

Таблица 9. Нарушения сперматогенеза у *M. kermanensis* (KER), *M. rossiaemeridionalis* (ROS), *M. mystacinus* (MYS), *M. arvalis* “obscurus” (ARV), *M. transcaspicus* (TRA) и их F1 гибридов.

Самки	Самцы	N	Последняя стадия сперматогенеза	Сперматогенез	Мейотическая профазы I
KER	KER	1	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
ROS	ROS	7	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
MYS	MYS	7	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
ARV	ARV	1	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
TRA	TRA	1	Сперматозоиды	Без нарушений	Без нарушений
KER	ROS	3	Сперматозоиды	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, уменьшение пула сперматид и остановка мейоза в части канальцев; остановка на стадии сперматид	Асинапсис до трех аутомомных бивалентов. γ H2A.X в местах асинапсиса. Число поздних рекомбинационных узелков не снижено
ROS	KER	4	Сперматозоиды; сперматиды; сперматогонии	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, и остановка мейоза в части канальцев; остановка на стадии сперматогоний	Асинапсис до трех аутомомных бивалентов. γ H2A.X в местах асинапсиса. Число поздних рекомбинационных узелков не снижено
KER	MYS	4	Сперматиды	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы, уменьшение пула сперматид; остановка на стадии сперматид	Асинапсис до трех аутомомных бивалентов. γ H2A.X в местах асинапсиса. Число поздних рекомбинационных узелков снижено
MYS	KER	2	Сперматозоиды; сперматоциты	Остановка на стадии сперматид в большинстве канальцев; остановка мейоза в большинстве канальцев	1) Асинапсис до двух аутомомных бивалентов. Число поздних рекомбинационных узелков не снижено. 2) Асинапсис большинства аутомом. γ H2A.X в местах асинапсиса.
MYS	ROS	8	Сперматозоиды; сперматиды; сперматоциты	Аномальные сперматозоиды, уменьшение пула сперматид, сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы; остановка мейоза	1) Асинапсис до трех аутомомных бивалентов. Число поздних рекомбинационных узелков не снижено. 2) Асинапсис большинства аутомом. γ H2A.X в местах асинапсиса.
ROS	MYS	8	Сперматиды; сперматоциты	Сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы; остановка мейоза	1) Число поздних рекомбинационных узелков не снижено. 2) Асинапсис большинства аутомом. γ H2A.X в местах асинапсиса.
ARV	KER	3	Сперматозоиды; сперматоциты	Аномальные сперматозоиды и сперматиды; остановка мейоза в части канальцев	Асинапсис аутомом, униваленты, гетероморфные биваленты, триваленты. γ H2A.X в местах асинапсиса. У одного гибрида единичные сигналы MLH1.
KER	TRA	2	Сперматоциты	Остановка мейоза	Асинапсис всех аутомом. γ H2A.X в местах асинапсиса.

В близкородственных межвидовых скрещиваниях полевок как рода *Microtus*, так и *Alexandromys*, мы наблюдали достаточно необычный фенотип - сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы. Подобное явление редко встречается в литературе (MacGregor et al., 1990; Meyer et al., 1996; Schwahn et al., 2018; Morohoshi et al., 2019), однако заслуживает отдельного изучения. В одном из исследований авторы использовали мышей, нокаутных по одному из компонентов клеточной системы транспорта пероксисом, *Pex13*, у которых этот ген был «выключен» на стадии сперматогоний с помощью STRA8-индуцируемой Cre рекомбиназы (Brauns et al., 2019). Было показано, что дифференцировка половых клеток была прервана на стадии круглых сперматид с образованием многоядерных гигантских клеток и гибелью зрелых сперматид. Таким образом, нарушение, вызванное на ранней стадии развития сперматогенного эпителия, фенотипически проявилось на две стадии позже, что вероятно связано с активной экспрессией белковых продуктов на более ранних стадиях для использования клетками с плотной упаковкой хроматина на поздних стадиях сперматогенеза согласно механизму «отложенной трансляции» (Lardone et al., 2021). Подобный фенотип ранее наблюдали у гибридов и мышей, и полевок. Шван и соавторы (2018) связывают проявление данного фенотипа и апоптоз первичных сперматоцитов у гибридов F2 между *Mus musculus domesticus* и *M. m. musculus* с наличием эпистатических взаимодействий между хромосомами 17 и X. Все это свидетельствует о комплексном механизме поддержания нормального прохождения сперматогенеза.

2.2 Основная причина остановки мейоза у гибридов рода *Microtus* связана с асинапсисом хромосом

Мы обнаружили, что выраженность мейотических aberrаций у гибридов соответствовала степени нарушения сперматогенеза. Она также возрастала с увеличением филогенетических дистанций между родительскими видами. Так, у гибридов между близкородственными видами *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis* в большинстве сперматоцитов не наблюдалось нарушений синапсиса и рекомбинации. В некоторых клетках только несколько пар хромосом наименьшего размера были асинаптированы к концу пахитены, что было описано впервые (Рис. 12Г-Е). Ранее для гибридов *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* было показано отсутствие синаптических нарушений при значительном снижении числа сперматозоидов (Safronova et al., 2011). Напротив, во всех клетках у гибридов между наиболее отдаленными видами *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* ни одна пара хромосом не была спарена.

Частичный или полный асинапсис гомологичных хромосом является наиболее частым нарушением мейоза у гибридов млекопитающих (Chandley et al., 1974; Zong and Fan, 1989; Borodin et al., 1998; Bhattacharyya et al., 2013; Ishishita et al., 2015; Torgasheva and Borodin, 2016). Вероятно, это связано с быстрым возникновением несовместимости по элементам генных сетей, контролирующим возникновение и репарацию двунитевых разрывов ДНК, образование теломерного букета и выравнивание гомологов в начале профазы I мейоза.

Наиболее детальные исследования молекулярной системы, контролирующей образование двунитевых разрывов, были проведены на фертильных и стерильных самцах гибридов между лабораторными линиями, ведущими начало от двух подвидов домашней мыши *M. m. musculus* и *M. m. domesticus* (Mihola et al., 2009; Bhattacharyya et al., 2013; Davies et al., 2016; Smagulova et al., 2016; Mukaj et al., 2020). Было показано, что система, контролирующая расположение двунитевых разрывов вдоль хромосом, включает в себя взаимодействия между белком PRDM9 и его мишенями, мотивами горячих точек рекомбинации (Baudat et al., 2010; Parvanov et al., 2010). PRDM9 и его ДНК мотивы связывания претерпевают быструю ко-эволюцию, вызванную эрозией горячих точек рекомбинации. Несовместимость этих систем у гибридов приводит к асимметричному распределению двунитевых разрывов вдоль гомологичных хромосом у гетерозигот (Davies et al., 2016; Smagulova et al., 2016). Это, в свою очередь, влияет на скорость репарации разрывов и поиск гомологии, что ведет к нарушению синапсиса хромосом. Нерепарированные разрывы ДНК запускают γ H2A.X-опосредованную инактивацию транскрипции неспаренного хроматина (Carofiglio et al., 2013), что может приводить к остановке мейоза (Turner et al., 2006).

Подобные нарушения могут объяснить, почему у близкородственных гибридов мы наблюдали асинапсис преимущественно маленьких хромосом. По-видимому, это связано с пропорционально меньшим числом горячих точек рекомбинации, расположенных на этих небольших хромосомах. Если некоторые из них были асимметричными, это могло значительно задержать синапсис, в то время как более длинные хромосомы с большим количеством горячих точек имели более высокую вероятность нести по крайней мере один симметричный двунитевой разрыв, который бы инициировал гомологичный синапсис. Подобный феномен, когда более короткие аутосомы более чувствительны к нарушению синапсиса, был ранее описан у мышей (Gregorova et al., 2018).

Однако несмотря на то, что несколько коротких хромосом подвергались мейотической транскрипционной инактивации, маркером которой является γ H2A.X (Рис.

12E), количество хроматина, подвергнутого принудительному сайленсингу, было небольшим. Его было недостаточно, чтобы инициировать остановку мейоза и апоптоз. Однако даже такие незначительные нарушения синапсиса привели к образованию аномальных сперматозоидов и к полной стерильности. Вероятно, это связано с сохранением подавления транскрипции инактивированных ранее хромосомных районов в сперматиде, что в норме описано для половых хромосом у самцов (Turner et al., 2006).

У гибридов между более далекими видами *M. kermanensis* с одной стороны и *M. arvalis* и *M. transcaspicus*, с другой стороны, у которых мейоз останавливался на лептотене-зиготене, наличие большого числа двунитевых разрывов, вероятно, активировало точку контроля целостности ДНК, что приводило к гибели клетки. Асинапсис большого числа аутосом, в свою очередь, вызывал массовое подавление транскрипционной активности многих генов, что также способствовало гибели сперматоцитов.

2.3 Межвидовые гибридные самцы группы «mystacinus» стерильны, что связано преимущественно с генетической дивергенцией

Все исследованные межвидовые гибриды рода *Microtus* были стерильны. Репродуктивный барьер был более выражен между видами *M. kermanensis* и *M. arvalis*, *M. kermanensis* и *M. transcaspicus*, при этом оба пола получившихся гибридов стерильны (Vikchurina et al., 2021). Для этих пар видов характерна значительная генетическая и кариотипическая дивергенция. Генетическая дивергенция (двухпараметрическая дистанция Кимуры K2P), основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей *cytb*, составляет 6,1% между *M. kermanensis* и *M. arvalis* и 7,8% между *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* (Mahmoudi et al., 2017; Golenishchev et al., 2019); кроме того, кариотип *M. kermanensis* различается по крайней мере по 14 хромосомным перестройкам с кариотипом *M. arvalis* и по 8 перестройкам с кариотипом *M. transcaspicus* (Mazurok et al., 2001).

Самцы F1 *M. mystacinus* x *M. kermanensis*, *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* и *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis* также были стерильны, тогда как самки F1 были фертильны, что согласуется с правилом Холдейна (Haldane, 1922; Vikchurina et al., 2021). Три данных вида имеют одинаковое диплоидное и фундаментальное число хромосом (Таблица 4) и морфологию. Анализ последовательностей *cytb* также указывает на филогенетическую близость видов. Голенищев с соавт. (2019) оценили филогенетические расстояния между последовательностями ДНК *cytb* *M. kermanensis*, *M. mystacinus* и *M. rossiaemeridionalis* в 4,0–4,4%. Тем не менее, у этих видов уже сформировалась генетическая несовместимость, следствием чего является гибридная стерильность у

самцов. Следовательно, эти таксономические формы группы «*mystacinus*» следует считать действительными биологическими видами.

Наши результаты указывают на соответствие между генетической дивергенцией и межвидовой генетической несовместимостью. Они также являются дополнительными данными к результатам Аллена с соавт. (2020), которые продемонстрировали корреляцию между генетическими дистанциями, рассчитанными для *cytb*, и наличием гибридной стерильности между некоторыми видами млекопитающих. Они предположили, что самцы гибридов между видами, у которых последовательности ДНК *cytb* отличаются друг от друга более чем на 7,2% пар оснований, обычно стерильны; когда же отличия *cytb* становятся больше 12%, стерильны гибриды обоих полов.

Согласно нашим данным, виды подрода *Microtus* достигают генетической несовместимости, результатом которой является гибридная стерильность у самцов или у обоих полов, на меньшей генетической дистанции. В рамках данной работы мы не можем разделить вклад кариотипической и генетической дивергенции; однако мы можем заключить, что накопление различных хромосомных перестроек у разных видов полевок *Microtus*, по-видимому, сыграло незначительную роль в формировании гибридной стерильности. Например, при скрещивании хромосомных форм *M. arvalis* «*arvalis*» и «*obscurus*», различающихся серией перичентрических инверсий и центромерных сдвигов (Mazurok et al., 1996, 2001) (Basheva et al., 2014a), все полученные гибриды фертильны и в природе, и в лаборатории (Meyer et al., 1996). Было показано, что у самок гибридов между *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis*, кариотипы которых отличаются друг от друга 14 хромосомными перестройками, в некоторых профазных ооцитах синапсис и рекомбинация хромосом протекают почти без нарушений (Torgasheva and Borodin, 2016). Такие гибриды способны производить беккроссов, хоть и с весьма низкой частотой (Gileva et al., 2001).

Независимая эволюция видов, между которыми полностью или частично прекратился поток генов, приводит к накоплению генетической несовместимости между системами, контролирующими процессы гомологичного узнавания, синапсиса и рекомбинации. У гибридов между филогенетически более далекими видами происходит массовое подавление транскрипции хроматина и отсутствие инициации синапсиса, что приводит к массовому блоку мейоза в начале первой профазы. Все вышеперечисленное является механизмами формирования гибридной стерильности, однако степень стерильности зависит от степени выраженности конкретного молекулярного механизма.

3 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Phodopus*

3.1 Основная причина стерильности самцов гибридов типа *Б* связана с нарушением синапсиса половых хромосом

Мы выявили, что самцы гибридов F1 между *P. sungorus* и *P. campbelli* стерильны, что полностью согласуется с предыдущими исследованиями (Sokolov and Vasil'eva, 1993; Safronova et al., 1999; Ishishita et al., 2015). Ранее было показано, что степень нарушения сперматогенеза у самцов гибридов переменна (Ishishita et al., 2015). Мы подтвердили ранее описанную гетерогенность гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* по стадии остановки сперматогенеза, однако мы выделили два, а не три типа гибридов (Таблица 10). Так, у гибридов типа *А* сперматогенез доходил до профазы I мейоза лишь в единичных клетках. Важно отметить, что малое число сперматогоний в канальцах у гибридов типа *А* указывает на то, что премейотические стадии также активно подвержены нарушениям (Рис. 14Б). Эта изменчивость в фенотипе стерильности, вероятно, определяется случайным образом и может быть связана в том числе с генетической изменчивостью среди родительских особей. Карликовые хомячки размножаются как аутбредные колонии и потому генетически гетерогенны, хотя уровень гетерогенности у них ниже, чем у большинства аутбредных линий других лабораторных грызунов (Brekke et al., 2018). Основной причиной стерильности гибридов типа *Б* была остановка мейоза на стадии пахитены с последующим апоптозом сперматоцитов (Рис. 14). Те клетки, которые преодолевали точку контроля пахитены, доходили до стадии сперматозоидов, однако их развитие было нарушено.

Ишишита с коллегами (2015) предположили, что асинапсис X- и Y-хромосом была основной причиной стерильности у самцов гибридов карликового хомячка типа *Б*. Мы также обнаружили высокую частоту асинапсиса X- и Y-хромосом (около 80%) у гибридов F1, тогда как у самцов родительского вида она была в восемь раз ниже. Эти данные хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований, хотя мы обнаружили несколько менее контрастные различия между гибридами и родительскими видами по частоте этой aberrации (Safronova et al., 1992; Ishishita et al., 2015). Данное несоответствие может быть обусловлено генетическими различиями между родительскими линиями, использованными в экспериментах по гибридизации и/или разными методами определения мейотических стадий. Со времен Мозеса (1977) синапсис X- и Y-хромосом используется в качестве основного маркера определения подстадий профазы I. Очевидно, что это не работает в случае гибридов из-за высокой частоты асинапсиса половых хромосом. Присутствие сигналов MLH1 на аутосомах является более надежным маркером клеток средней-поздней

пахитены (Ashley et al., 2004). Учитывая, что только около 20% бивалентов XY вовлечены в синапсис (Таблица 6) и из них менее половины имеют сигнал MLH1, у гибридов PCA x PSU более 90% сперматоцитов могут быть ахиазматическими. Относительно высокая частота бивалентов XY без сигналов MLH1 во всех группах (более 30%) может быть связана с поздним формированием рекомбинационных узелков или их временной природой. У млекопитающих они обычно появляются и исчезают на XY раньше, чем на аутосомных бивалентах (Anderson et al., 1999; Basheva et al., 2008; Mary et al., 2014). Было показано, что у человека частота бивалентов XY без MLH1 коррелирует с частотой анеуплоидных по половым хромосомам сперматозоидов (Sun et al., 2008).

Таблица 10. Нарушения гаметогенеза у *Phodopus sungorus* (PSU), *P. campbelli* (PCA) и их F1 гибридов.

Самки	Самцы	Пол	N	Последняя стадия гаметогенеза	Гаметогенез	Мейотическая профазы I
Родительские виды						
PSU	PSU	♂	5	Сперматозоиды	Без нарушений	Низкая частота интерлокинга и асинапсиса половых хромосом
PSU	PSU	♀	3	Гистологический анализ не проводился		У полового бивалента невыровненные центромеры встречаются редко
PCA	PCA	♂	5	Сперматозоиды	Без нарушений	Низкая частота интерлокинга и асинапсиса половых хромосом
PCA	PCA	♀	3	Гистологический анализ не проводился		У полового бивалента невыровненные центромеры встречаются редко
Межвидовые гибриды						
PCA	PSU	♂	8	Сперматогонии у гибридов типа А. Сперматозоиды у гибридов типа Б.	Тип А: редкие сперматогонии. Тип Б: редкие сперматиды и единичные сперматозоиды аномальной морфологии. Пахитеновый арест большей части сперматоцитов I.	Низкая частота интерлокинга, но высокая частота асинапсиса половых хромосом
PCA	PSU	♀	4	Гистологический анализ не проводился		У полового бивалента невыровненные центромеры встречаются часто

В отличие от некоторых предыдущих исследований (Safronova et al., 1999), мы не обнаружили серьезных нарушений синапсиса и рекомбинации аутосом у самцов и самок гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* в сравнении с родительскими видами (Рис. 15, Рис. 17, Рис. 18). Маловероятно, что дивергенция нуклеотидных последовательностей аутосом у двух видов мохноногих хомячков, которая приводит к нарушению распознавания

гомологии, является причиной стерильности гибридов. Следовательно, основная причина стерильности – асинапсис XY-бивалента. Почему асинапсис приводит к остановке мейоза и в чем причина высокой частоты асинапсиса у гибридов?

3.2 Нарушение мейотической и постмейотической инактивации генов ПАР является вероятной причиной стерильности самцов гибридов карликовых хомячков рода *Phodopus*

Известно, что синапсис и рекомбинация в псевдоаутосомном районе (ПАР) необходимы для прохождения пахитенной точки контроля мейоза и корректной сегрегации половых хромосом (Miklos, 1974; Burgoyne and Mahadevaiah, 1993; Rodriguez and Burgoyne, 2000; Helena Mangs and Morris, 2007). Причиной нарушения сперматогенеза вследствие асинапсиса XY может быть нарушение мейотического сайленсинга половых хромосом (MSCI). Этот процесс является частью более общего механизма мейотической инактивации несинаптированного хроматина (MSUC). В мейозе у самцов млекопитающих дивергировавшие части X- и Y-хромосом остаются асинаптированными и содержат нерепарированные двунитевые разрывы ДНК. Сохранение двунитевых разрывов ДНК до пахитены приводит к привлечению киназы ATR, которая в том числе фосфорилирует гистон H2A.X, что приводит к инактивации транскрипции неспаренных районов полового бивалента и образованию полового пузырька. Это неактивное состояние хроматина половых хромосом сохраняется в сперматиде (Turner, 2015).

В норме ПАР полностью синаптирован к середине пахитены. На этой стадии он не содержит нерепарированных двунитевых разрывов ДНК и не метится антителами к γ H2A.X (Рис. 21А, Г). Гены, расположенные в ПАР, избегают мейотической инактивации как в мейозе самок, так и самцов (Raudsepp and Chowdhary, 2016). В семенниках мыши была обнаружена экспрессия нескольких генов, расположенных в ПАР, таких как *Sts* (Raman and Das, 1991) и *Mid1* (*Fxy*) (Palmer et al., 1997). Было показано, что *Sts*, стероидсульфатаза участвует в поддержании нормального тестикулярного гормонального микроокружения (Lardone et al., 2021). *Mid1* может быть связан с клетками сперматогониального ряда, так как для них характерна активная пролиферация.

Не исключено, что распространение мейотического сайленсинга на ПАР и инактивация генов, необходимых для прохождения сперматогенеза, могут быть причиной остановки мейоза в сперматоцитах с асинапсисом половых хромосом. Таким образом, асинапсис XY может приводить к возникновению гибридной стерильности.

3.3 Гетерохроматиновый блок на Xp ускоряет межвидовую дивергенцию ПАР

Второй вопрос заключается в том, почему синапсис половых хромосом нарушен у гибридов хомячков. Прямой причиной асинапсиса в любой части хромосомы у гибридов является потеря гомологии. Исследования гибридов мышей показали, что генетическая дивергенция ПАР между родительскими подвидами и видами коррелирует с частотой асинапсиса XY (Hale et al., 1993; Dumont, 2017). Для ПАР человека-шимпанзе/человека-орангутанга характерен более высокий уровень нуклеотидных замен в интронах *SHOX*, *PPP2R3L* и *ASMT* ($K = 5.7-8.7\%$) по сравнению со средней дивергенцией некодирующих последовательностей между человеком и человекообразными обезьянами ($K = 3\%$) или уровнем дивергенции X-специфичных генов ($K = 2.7\%$) (Filatov and Gerrard, 2003). Особенно высокая скорость дивергенции ПАР обнаружена у грызунов. Даже близкородственные виды мышей различаются генетическим содержанием ПАР и расположением границы между ПАР и специфическими областями половых хромосом (Perry and Ashworth, 1999). У многих видов грызунов, по-видимому, развился альтернативный механизм сегрегации X и Y в мейозе, так как они полностью утратили ПАР (de la Fuente et al., 2012; Horn et al., 2012; Graves, 2016).

Основной причиной быстрой эволюции ПАР является его высокий уровень рекомбинации в мейозе у самцов. Иными словами, там практически всегда происходит один облигатный обмен. У мужчин уровень рекомбинации в ПАР1 в 17 раз выше, чем уровень рекомбинации в среднем по геному (Hinch et al., 2014). У самцов мышей уровень рекомбинации в ПАР в 7 раз выше, чем у самок (Soriano et al., 1987). Высокий уровень рекомбинации неизбежно приводит к геномной нестабильности ПАР и к повышенной индивидуальной изменчивости однонуклеотидных полиморфизмов, сегментных дупликаций и вариаций числа копий (Ross et al., 2005; Bussell et al., 2006).

Мутации, которые произошли в ПАР у самцов, могут репарироваться во время мейоза у самок или сегрегировать в разные гаметы в ходе оогенеза, а затем элиминироваться путем естественного отбора. Однако у млекопитающих хомячков этот путь гомогенизации ПАР полностью заблокирован. ПАР у них расположен на гетерохроматиновом плече Xp (Vistorin et al., 1977; Schmid et al., 1986; Romanenko et al., 2007) (Рис. 20Б), которое, как мы продемонстрировали, асинаптировано в большей части клеток у гибридов (Рис. 19В, Г, Рис. 21Б, Д; Таблица 6) или синаптировано негомологично и поэтому недоступно для рекомбинации в мейозе у самок (Рис. 22; Таблица 7). Известно, что наличие гетерохроматинового блока на хромосоме подавляет рекомбинацию в этом районе (Stack, 1984; Ashley, 1988; Dumont, 2016) (Рис. 22Б). Мы наблюдаем полное

отсутствие кроссинговера: ни у самок гибридов, ни у самок родительских видов мы не обнаружили ни одного бивалента XX с сигналом MLH1 на Xp (Рис. 18). Блок рекомбинации на всем протяжении Xp, включая ПАР, должен приводить к его ускоренной межвидовой дивергенции и деградации.

Таким образом, вместо гомогенизации внутреннего содержимого ПАР, в котором неизбежно накапливаются мутации в ходе мейоза у самцов, биваленты XX, по-видимому, аккумулируют и распределяют внутри вида свой собственный груз мутаций в ПАР. Сочетание этих двух факторов — высокий уровень рекомбинации в ПАР в мейозе у самцов и отсутствие рекомбинации в ПАР в ходе мейоза у самок — ускоряет его эволюцию. Из-за быстрой межвидовой дивергенции ПАР происходит потеря гомологии нуклеотидных последовательностей ПАР, что приводит к высокой частоте асинопсиса половых хромосом у межвидовых гибридов, что, в свою очередь, вероятно, является основной причиной гибридной стерильности у самцов мохноногих хомячков. Другие проявления генетической несовместимости, такие как нежизнеспособность реципрокных гибридов и остановка сперматогенеза на стадии сперматогоний у гибридов типа *A*, вероятно, возникали независимо друг от друга, и их механизмы еще предстоит изучить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы исследовали механизмы формирования гибридной стерильности у некоторых близкородственных видов Хомяковых: серых полевков родов *Alexandromys* и *Microtus* и мохноногих хомячков рода *Phodopus*. Особенностью данных видов является их сравнительно небольшое время дивергенции и аллопатрический сценарий видообразования. Однако для каждой из моделей характерны свои особенности.

Три исследованных вида полевков рода *Alexandromys* дивергировали относительно недавно, около 110 тыс. лет назад, и характеризуются значительной кариотипической дивергенцией и внутривидовым хромосомным полиморфизмом. Пять исследованных видов полевков рода *Microtus* различаются как по времени дивергенции (от 60 до 250 тыс. лет), так и по степени кариотипических различий: наиболее близкие виды имеют практически идентичные кариотипы, а филогенетически более далекие различаются по серии хромосомных перестроек. Два изученных вида мохноногих хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli* дивергировали около 1 млн лет назад, при этом их кариотипы отличаются лишь по блокам гетерохроматина. Изучение особенностей сперматогенеза, синапсиса и рекомбинации хромосом у гибридов между видами, различающимися по времени дивергенции, с одной стороны, и по числу и типу накопленных хромосомных различий, с другой, позволило нам оценить относительную роль генетической и кариотипической дивергенции в формировании гибридной стерильности в отдельных группах видов и выявить общие и специфические цитологические механизмы, лежащие в основе этого явления.

Самым распространенным нарушением сперматогенеза, которое наблюдалось в большей части или во всех семенных канальцах у всех исследуемых гибридов, было накопление половых клеток на стадии первичных сперматоцитов, которые затем подвергались апоптозу. В некоторых случаях наблюдалось образование небольшого числа аномальных сперматид и сперматозоидов.

Цитологический механизм стерильности – асинапсис гомологичных хромосом в профазе мейоза -- был общим для всех трех таксонов. Различия заключались в типе асинаптированных хромосом (это были аутосомы в случае полевков и половые хромосомы в случае хомячков), протяженности асинаптированных участков (целые хромосомы или их отдельные районы) и причинах возникновения асинапсиса.

Во всех случаях нарушения синапсиса инициировали сайленсинг неспаренного хроматина, о чем свидетельствовало интенсивное мечение неспаренных районов хромосом

антителами к фосфорилированной форме гистона H2A. В тех случаях, когда в асинапсис были вовлечены протяженные участки аутосом, целые аутосомы или псевдоаутосомный район половых хромосом, их сайленсинг мог приводить к остановке мейоза на стадии профазы I и гибели сперматоцитов. Если неспаренными оставались небольшие участки аутосом или малое число коротких аутосом, их сайленсинг мог приводить к отложенным нарушениям сперматогенеза и образованию aberrантных сперматид и сперматозоидов.

Причины асинапсиса были, по-видимому, разными у гибридов в разных группах видов. У гибридов между относительно давно дивергировавшими видами полевок рода *Microtus*, асинапсис мог быть обусловлен значительной дивергенцией последовательностей ДНК, участвующих в образовании двунитевых разрывов на стадии лептотены, поиске гомологичных участков хромосом и мисс-матч репарации разрывов на стадии зиготены. На это указывало образование унивалентов и мультивалентов, в которые были вовлечены в том числе неперестроенные хромосомы родительских видов, наличие протяженных участков асинапсиса в бивалентах и мультивалентах и значительное снижение уровня рекомбинации. Кариотипическая дивергенция видов рода *Microtus* играла не основную, а дополнительную роль в нарушениях синапсиса их межвидовых гибридов, замедляя пресинаптическое выравнивание гомологов и усложняя поиск гомологичных районов. Так мейоз у гибридов между рано дивергировавшими видами *M. transcaspicus* и *M. kermanensis* останавливался на более ранней стадии, чем у гибридов между видами *M. arvalis* и *M. kermanensis*, дивергировавшими позднее, несмотря на то что первые различались по 8 перестройкам, а последние по 14.

Хромосомно полиморфные виды рода *Alexandromys* дивергировали относительно недавно и, по-видимому, не успели накопить значительных различий в нуклеотидных последовательностях, но при этом независимо зафиксировали множество различных хромосомных перестроек (инверсий, центромерных сдвигов, Робертсоновских и tandemных транслокаций, вовлекающих одни и те же плечи хромосом, но в разных комбинациях). У внутривидовых гибридов между хромосомными расами – простых гетерозигот по нескольким (до 9) перестройкам мы не наблюдали нарушений синапсиса и рекомбинации и, как следствие, – сперматогенеза. В то же время, у межвидовых гибридов, которые являлись сложными гетерозиготами не менее чем по 15 перестройкам, часть из которых перекрывалась внутри одной и той же хромосомы, синапсис хромосом был затруднен. Можно думать, что именно сложная гетерозитность по таким перестройкам была основной причиной асинапсиса в мультивалентах, образованных гомологичными плечами хромосом. Топологическая сложность таких синаптических конфигураций ограничивала возможность

физических контактов между гомологами и приводила к образованию протяженных районов асиапсиса. В то же время большая часть хромосомных плеч, вовлеченных в перестройки, синаптировала хотя бы частично и общий уровень рекомбинации у межвидовых гибридов рода *Alexandromys* был сравним с таковым у родительских видов. Униваленты были редки и неперестроенные хромосомы родительских видов, как правило, не участвовали в образовании мультивалентов. Следовательно, можно сделать вывод о сохранении гомологии нуклеотидных последовательностей у разных видов и не столь значимой роли генетической дивергенции, в сравнении с кариотипической, в формировании стерильности у гибридов.

Таким образом, накопление хромосомных перестроек в небольших изолированных популяциях было важным механизмом видообразования у полевок рода *Alexandromys*, в отличие от полевок рода *Microtus*, где значимую роль в формировании репродуктивной несовместимости сыграла генетическая дивергенция.

Достаточно длительный период географической изоляции исследуемых видов мохноногих хомячков рода *Phodopus* не привел к значительной генетической и кариотипической дивергенции их аутомсомных геномов. Мы не обнаружили нарушений синапсиса и рекомбинации аутомсомом у гибридов, что говорит о сохранении высокой гомологии нуклеотидных последовательностей, участвующих в образовании двунитевых разрывов и поиске гомологии. Нарушения сперматогенеза у гибридов были обусловлены асиапсисом половых хромосом, на которых расположен псевдоаутомсомный район. Мы полагаем, что быстрая дивергенция этого района у родительских видов была обусловлена наличием большого гетерохроматинового блока на коротком плече X-хромосомы, где он расположен, и подавлением рекомбинации в нем как у самцов, так и у самок. Накопление разных мутаций в этом районе у родительских видов могло быть основной причиной повышенной частоты асиапсиса X- и Y-хромосомом у гибридов.

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют предположить, что основной причиной стерильности гибридов между близкородственными видами Хомяковых является асиапсис целых хромосом или их отдельных районов, который может приводить к сайленсингу неспаренного хроматина и остановке сперматогенеза или формированию абберрантных нефункциональных гамет. Асиапсис может быть обусловлен как дивергенцией нуклеотидных последовательностей, участвующих в поиске гомологии на ранних стадиях профазы мейоза, так и фиксацией различных хромосомных перестроек, в том числе, вовлекающих одни и те же плечи хромосомом, но в разных комбинациях. Соотношение вкладов генетической и кариотипической дивергенции родительских видов в

формирование гибридной стерильности определяется продолжительностью независимой эволюции родительских таксонов, типом хромосомных перестроек, частотой их возникновения и фиксации.

Современные теории хромосомного видообразования обращают основное внимание на подавление рекомбинации на стадии пахитены в профазе I мейоза вокруг точек разрывов хромосомных перестроек (Rieseberg, 2001) либо на нарушение расхождения хромосом в ходе мейоза гибридов – гетерозигот по хромосомным перестройкам (White, 1978; King, 1993). Результаты нашего исследования показывают, что к формированию гибридной стерильности и, следовательно, к видообразованию могут приводить хромосомные взаимодействия на более ранних стадиях мейоза, когда происходит пресинаптическое выравнивание хромосом, образование двунитевых разрывов, поиск гомологии и мисс-матч репарация. Нарушения этих процессов, вызванные несовместимостью нуклеотидных последовательностей, в них участвующих, и/или гетерозиготностью по хромосомным перестройкам, ведущей к разобщению гомологичных районов хромосом в пространстве ядра, ведут к асинапсису хромосом и, как следствие, к нарушению сперматогенеза.

ВЫВОДЫ

1. У внутривидовых гибридов рода *Alexandromys*, которые являются простыми гетерозиготами по нескольким хромосомным перестройкам, показано нормальное течение сперматогенеза и отсутствие нарушений синапсиса и рекомбинации хромосом.

2. Причиной стерильности самцов межвидовых гибридов рода *Alexandromys* со сложной гетерозиготностью по хромосомным перестройкам и межвидовых гибридов рода *Microtus* является остановка сперматогенеза, которая, вероятно, вызвана многочисленными нарушениями синапсиса хромосом, приводящими к мейотической инактивации асинаптированных районов хромосом.

3. Показано, что степень нарушений синапсиса и рекомбинации у самцов межвидовых гибридов полевок рода *Microtus* возрастает с увеличением времени дивергенции и количества накопленных кариотипических различий между родительскими видами.

4. Причиной гибридной стерильности самцов межвидовых гибридов карликовых хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli* с идентичными кариотипами является остановка сперматогенеза на стадии сперматоцитов, которая, вероятно, вызвана нарушением синапсиса и рекомбинации в псевдоаутосомном районе половых хромосом.

5. Впервые выявлено отсутствие рекомбинации в псевдоаутосомном районе XX бивалента у фертильных самок гибридов, которое может вызывать быструю дивергенцию последовательностей этого района, что приводит к нарушениям синапсиса у самцов гибридов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Шереметьева, И. Н., Картавцева, И. В., and Васильева, Т. В. (2017). Обитает ли эворонская полевка (*Alexandromys evoronensis*) на северо-востоке Верхнезейской равнины? *Зоологический Журнал* 96, 477–484. doi:10.7868/S0044513417020076.
- Abramson, N. I., Lebedev, V. S., Tesakov, A. S., and Bannikova, A. A. (2009). Supraspecies relationships in the subfamily Arvicolinae (rodentia, cricetidae): An unexpected result of nuclear gene analysis. *Mol. Biol.* 43, 834–846. doi:10.1134/S0026893309050148.
- Ahmed, E. A., and de Rooij, D. G. (2009). Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol. Biol.* 558, 263–277. doi:10.1007/978-1-60761-103-5.
- Allen, R., Ryan, H., Davis, B. W., King, C., Frantz, L., Irving-Pease, E., et al. (2020). A mitochondrial genetic divergence proxy predicts the reproductive compatibility of mammalian hybrids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 20200690. doi:10.1098/rspb.2020.0690.
- Allen, W. R., and Short, R. V. (1997). Interspecific and extraspecific pregnancies in Equids: anything goes. *J. Hered.* 88, 384–392. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a023123.
- Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., De Rooij, D. G., Van Pelt, A. M. M., et al. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14976–14980. doi:10.1073/pnas.0807297105.
- Anderson, L. K., Reeves, A., Webb, L. M., and Ashley, T. (1999). Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151.
- Anderson, S. A. S., and Weir, J. T. (2022). The role of divergent ecological adaptation during allopatric speciation in vertebrates. *Science* 378, 1214–1218.
- Ashley, T. (1988). G-band position effects on meiotic synapsis and crossing over. *Genetics* 118, 307–317. doi:10.1093/Genetics/118.2.307.
- Ashley, T., Gaeth, A. P., Creemers, L. B., Hack, A. M., and de Rooij, D. G. (2004). Correlation of meiotic events in testis sections and microspreads of mouse spermatocytes relative to the mid-pachytene checkpoint. *Chromosoma* 113, 126–136. doi:10.1007/s00412-004-0293-5.
- Ashley, T., Plug, A. W., Xu, J., Solari, A. J., Reddy, G., Golub, E. I., et al. (1995). Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104, 19–28. doi:10.1007/bf00352222.

- Auton, A., Fledel-Alon, A., Pfeifer, S., Venn, O., Ségurel, L., Street, T., et al. (2012). A fine-scale chimpanzee genetic map from population sequencing. *Science* 336, 193–8. doi:10.1126/science.1216872.
- Ayala, F. J., and Coluzzi, M. (2005). Chromosome speciation: Humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 6535–6542. doi:10.1073/PNAS.0501847102.
- Baker, C. L., Kajita, S., Walker, M., Saxl, R. L., Raghupathy, N., Choi, K., et al. (2015). PRDM9 drives evolutionary erosion of hotspots in *Mus musculus* through haplotype-specific initiation of meiotic recombination. *PLoS Genet.* 11, e1004916. doi:10.1371/journal.pgen.1004916.
- Baker, C. L., Walker, M., Kajita, S., Petkov, P. M., and Paigen, K. (2014). PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res.* 24, 724–32. doi:10.1101/gr.170167.113.
- Bakloushinskaya, I. Y., Matveevsky, S. N., Romanenko, S. A., Serdukova, N. A., Kolomiets, O. L., Spangenberg, V. E., et al. (2012). A comparative analysis of the mole vole sibling species *Ellobius tancrei* and *E. talpinus* (Cricetidae, Rodentia) through chromosome painting and examination of synaptonemal complex structures in hybrids. *Cytogenet. Genome Res.* 136, 199–207. doi:10.1159/000336459.
- Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., De Rooij, D. G., et al. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat. Genet.* 38, 1430–1434. doi:10.1038/ng1919.
- Bannikova, A. A., Lebedev, V. S., Lissovsky, A. A., Matrosova, V., Abramson, N. I., Obolenskaya, E. V., et al. (2010). Molecular phylogeny and evolution of the Asian lineage of vole genus *Microtus* (Rodentia: Arvicolinae) inferred from mitochondrial cytochrome b sequence. *Biol. J. Linn. Soc.* 99, 595–613. doi:10.1111/j.1095-8312.2009.01378.x.
- Bannikova, A. A., Lebedev, V. S., Poplavskaya, N. S., Simanovsky, S. A., Undrakhbayar, E., Adiya, Y., et al. (2019). Phylogeny and phylogeography of arvicoline and lagurine voles of Mongolia. *Folia Zoologica* 68, 100–113. doi:10.25225/FOZO.002.2019.
- Basheva, E. A., Bidau, C. J., and Borodin, P. M. (2008). General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization. *Chromosom. Res.* 16, 709–719. doi:10.1007/S10577-008-1221-Y.
- Basheva, E. A., Torgasheva, A. A., Golenischev, F. N., Frisman, L. V., and Borodin, P. M. (2014a). Chromosome synapsis and recombination in the hybrids between chromosome races of the common vole *Microtus arvalis*: “ arvalis ” and “ obscurus .” 456, 735–737.

doi:10.1134/S0012496614030144.

- Basheva, E. A., Torgasheva, A. A., Gomez Fernandez, M. J., Boston, E., Mirol, P., and Borodin, P. M. (2014b). Chromosome synapsis and recombination in simple and complex chromosomal heterozygotes of tuco-tuco (*Ctenomys talarum*: Rodentia: Ctenomyidae). *Chromosom. Res.* 22, 351–363. doi:10.1007/s10577-014-9429-5.
- Basset, P., Yannic, G., Brünner, H., and Hausser, J. (2006). Restricted gene flow at specific parts of the shrew genome in chromosomal hybrid zones. *Evolution (N. Y.)* 60, 1718–1730. doi:10.1111/j.0014-3820.2006.tb00515.x.
- Bateson, W. (1909). Heredity and variation in modern lights. *Darwin Mod. Sci.* 85, 101. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10018121532>.
- Batsaikhan, N., and Tsytsulina, K. (2016). *Microtus maximowiczii*. *IUCN Red List Threat. Species*, e.T13442A115113061. doi:10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13442A22345590.en.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., et al. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science (80-)* 327, 836–840. doi:10.1126/science.1183439.
- Baudat, F., and Massy, de B. (2007). Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosom. Res.* 15, 565–577. doi:10.1007/s10577-007-1140-3.
- Bayes, J. J., and Malik, H. S. (2009). Altered heterochromatin binding by a hybrid sterility protein in *Drosophila* sibling species. *Science* 326, 1538–41. doi:10.1126/science.1181756.
- Belonogova, N. M., Polyakov, A. V., Karamysheva, T. V., Torgasheva, A. A., Searle, J. B., and Borodin, P. M. (2017). Chromosome synapsis and recombination in male hybrids between two chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus* L., Soricidae, Eulipotyphla). *Genes (Basel)* 8, 282. doi:10.3390/genes8100282.
- Bhattacharyya, T., Gregorova, S., Mihola, O., Anger, M., Sebestova, J., Denny, P., et al. (2013). Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E468-77. doi:10.1073/pnas.1219126110.
- Bhattacharyya, T., Reifova, R., Gregorova, S., Simecek, P., Gergelits, V., Mistrik, M., et al. (2014). X chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS Genet.* 10, e1004088. doi:10.1371/journal.pgen.1004088.
- Bikchurina, T. I., Golenishchev, F. N., Kizilova, E. A., Mahmoudi, A., and Borodin, P. M. (2021).

- Reproductive isolation between taxonomically controversial forms of the gray voles (Microtus, Rodentia; Arvicolinae): cytological mechanisms and taxonomical implications. *Front. Genet.* 12, 575. doi:10.3389/fgene.2021.653837.
- Bikchurina, T. I., Tishakova, K. V., Kizilova, E. A., Romanenko, S. A., Serdyukova, N. A., Torgasheva, A. A., et al. (2018). Chromosome synapsis and recombination in male-sterile and female-fertile interspecies hybrids of the dwarf hamsters (Phodopus, Cricetidae). *Genes (Basel)*. 9. doi:10.3390/genes9050227.
- Billings, T., Parvanov, E. D., Baker, C. L., Walker, M., Paigen, K., and Petkov, P. M. (2013). DNA binding specificities of the long zinc-finger recombination protein PRDM9. *Genome Biol.* 14, R35. doi:10.1186/gb-2013-14-4-r35.
- Biswas, U., Wetzker, C., Lange, J., Christodoulou, E. G., Seifert, M., Beyer, A., et al. (2013). Meiotic cohesin SMC1 β provides prophase I centromeric cohesion and is required for multiple synapsis-associated functions. *PLoS Genet.* 9, e1003985. doi:10.1371/journal.pgen.1003985.
- Borde, V. (2007). The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosom. Res.* 15, 551–563. doi:10.1007/s10577-007-1147-9.
- Börner, V., Kleckner, N., and Hunter, N. (2004). Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117.
- Borodin, P., Basheva, E., Torgasheva, A., Dashkevich, O., Golenishchev, F., Kartavtseva, I., et al. (2012). Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles. *Chromosome Res.* 20, 259–68. doi:10.1007/s10577-011-9261-0.
- Borodin, P., Karamysheva, T. V., Belonogova, N. M., Torgasheva, A. A., Rubtsov, N. B., and Searle, J. B. (2008). Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). *Genetics* 178.
- Borodin, P. M., Basheva, E. A., Torgasheva, A. A., Golenishchev, F. N., and Kartavtseva, I. V. (2010). Synapsis and chromosome recombination in the Muya vole (*Microtus mujanensis*). *Vestn. NGU. Ser. Biol. Clin. Med.* 8, 124–130.
- Borodin, P. M., Fedyk, S., Chętnicki, W., Torgasheva, A. A., Pavlova, S. V., and Searle, J. B. (2019). “Meiosis and fertility associated with chromosomal heterozygosity,” in *Shrews, Chromosomes and Speciation* Cambridge Studies in Morphology and Molecules: New Paradigms in Evolutionary Bio., eds. J. Zima, J. B. Searle, and P. D. Polly (Cambridge:

- Cambridge University Press), 217–270. doi:10.1017/9780511895531.008.
- Borodin, P. M., Gorlov, I. P., and Ladygina, T. Y. (1990). Synapsis in single and double heterozygotes for partially overlapping inversions in chromosome 1 of the house mouse. *Chromosoma* 99, 365–370. doi:10.1007/bf01731725.
- Borodin, P. M., Rodionova, M. I., Sablina, O. V., and Gorlov, I. P. (1992). Unusual heteromorphic bivalents in the common vole (*Microtus arvalis*) from Belorussia. *Cytogenet. Genome Res.* 60, 123–127.
- Borodin, P., Rogatcheva, M., Zhelezova, A., and Oda, S. (1998). Chromosome pairing in inter-racial hybrids of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Genome* 41, 79–90. doi:10.1139/g97-103.
- Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp. Cell Res.* 24, 495–507. doi:10.1016/0014-4827(61)90449-9.
- Brauns, A.-K., Heine, M., Todter, K., Baumgart-Vogt, E., Luers, G. H., and Schumacher, U. (2019). A defect in the peroxisomal biogenesis in germ cells induces a spermatogenic arrest at the round spermatid stage in mice. *Sci. Rep.* 9, 1–17. doi:10.1038/s41598-019-45991-6.
- Brekke, T. D., Henry, L. A., and Good, J. M. (2016). Genomic imprinting, disrupted placental expression, and speciation. *Evolution*. doi:10.1111/evo.13085.
- Brekke, T. D., Steele, K. A., and Mulley, J. F. (2018). Inbred or outbred? Genetic diversity in laboratory rodent colonies. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 8, 679–686. doi:10.1534/G3.117.300495/-/dc1.
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., and Petukhova, G. V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* 485, 642–645. doi:10.1038/nature11089.
- Brown, J. D., and O’Neill, R. J. (2010). Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 291–316. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141554.
- Burgoyne, P. S. (1982). Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum. Genet.* 61, 85–90.
- Burgoyne, P. S., and Mahadevaiah, S. K. (1993). Unpaired sex chromosomes and gametogenic failure. *Chromosom. Today* 11, 243–263.
- Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., and Turner, J. M. (2009). The consequences of asynapsis for

- mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 10, 207–216.
- Bussell, J. J., Pearson, N. M., Kanda, R., Filatov, D. A., and Lahn, B. T. (2006). Human polymorphism and human–chimpanzee divergence in pseudoautosomal region correlate with local recombination rate. *Gene* 368, 94–100. doi:10.1016/j.gene.2005.10.020.
- Capilla, L., Garcia Caldés, M., and Ruiz-Herrera, A. (2016). Mammalian meiotic recombination: a toolbox for genome evolution. *Cytogenet. Genome Res.* doi:10.1159/000452822.
- Carbone, L., Nergadze, S. G., Magnani, E., Misceo, D., Francesca Cardone, M., Roberto, R., et al. (2006). Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. *Genomics* 87, 777–782. doi:10.1016/j.ygeno.2005.11.012.
- Carofiglio, F., Inagaki, A., de Vries, S., Wassenaar, E., Schoenmakers, S., Vermeulen, C., et al. (2013). SPO11-Independent DNA repair foci and their role in meiotic silencing. *PLoS Genet.* 9. doi:10.1371/journal.pgen.1003538.
- Carpenter, A. (1979). Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92, 511–41.
- Chandley, A. C., Jones, R. C., Dott, H. M., Allen, W. R., and Short, R. V. (1974). Meiosis in interspecific equine hybrids. I. The male mule (*Equus asinus* X *Equus caballus*) and hinny (*Equus caballus* X *Equus asinus*). *Cytogenet Cell Genet.* Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303199686>.
- Chandley, A. C., Short, R. V., and Allen, W. R. (1975). Cytogenetic studies of three equine hybrids. *Reprod Fertil Suppl.* 23, 356–370.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198–236. doi:10.1152/physrev.1972.52.1.198.
- Close, R. L., and Lowry, P. S. (1989). Hybrids in marsupial research. *Aust. J. Zool.* 37, 259–267. doi:10.1071/zo9890259.
- Cloutier, J. M., and Turner, J. M. A. (2010). Meiotic sex chromosome inactivation. *Curr. Biol.* 20, R962–R963. doi:10.1016/j.cub.2010.09.041.
- Cole, F., Kauppi, L., Lange, J., Roig, I., Wang, R., Keeney, S., et al. (2012). Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat. Cell Biol.* 14, 424–430. doi:10.1038/ncb2451.
- Coyne, J., and Orr, H. (2004). *Speciation*. Sunderland, MA doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01020.x.

- Cromie, G. A., and Smith, G. R. (2007). Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol.* 17, 448–455. doi:10.1016/j.tcb.2007.07.007.
- Czech, B., Munafò, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E. L., Fabry, M. H., Kneuss, E., et al. (2018). piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441> 52, 131–157. doi:10.1146/annurev-genet-120417-031441.
- Daniel, K., Lange, J., Hached, K., Fu, J., Anastassiadis, K., Roig, I., et al. (2011). Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1. *Nat. Cell Biol.* 13, 599–610. doi:10.1038/ncb2213.
- Davies, B., Hatton, E., Altemose, N., Hussin, J. G., Pratto, F., Zhang, G., et al. (2016). Re-engineering the zinc fingers of PRDM9 reverses hybrid sterility in mice. *Nature* 530, 171–176. doi:10.1038/nature16931.
- de Boer, P., Searle, A. G., van der Hoeven, F. A., de Rooij, D. G., and Beechey, C. V. (1986). Male pachytene pairing in single and double translocation heterozygotes and spermatogenic impairment in the mouse. *Chromosoma* 93, 326–336. doi:10.1007/bf00327591.
- de la Fuente, R., Sánchez, A., Marchal, J. A., Viera, A., Parra, M. T., Rufas, J., et al. (2012). A synaptonemal complex-derived mechanism for meiotic segregation precedes the evolutionary loss of homology between sex chromosomes in arvicolid mammals. *Chromosoma* 121, 433–46. doi:10.1007/s00412-012-0374-9.
- De Rooij, D. G., and Griswold, M. D. (2012). Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J. Androl.* 33, 1085–1095. doi:10.2164/jandrol.112.016832.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819–830. doi:10.1016/S1534-5807(02)00165-X.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev. Cell* 12, 863–872. doi:10.1016/j.devcel.2007.03.018.
- Dobzhansky, T. (1937). Genetic nature of species differences. *Am. Nat.* 71, 404–420. doi:10.1086/280726.
- Dover, G., and Flavell, R. (1984). Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. *Cell* 38, 622–3.
- Dumont, B. (2016). Variation and evolution of the meiotic requirement for crossing over in mammals. *Genetics*, genetics.116.192690. doi:10.1534/genetics.116.192690.

- Dumont, B. L. (2017). Meiotic consequences of genetic divergence across the murine pseudoautosomal region. *Genetics* 205, 1089–1100. doi:10.1534/genetics.116.189092.
- Dzur-Gejdosova, M., Simecek, P., Gregorova, S., Bhattacharyya, T., and Forejt, J. (2012). Dissecting the genetic architecture of f_1 hybrid sterility in house mice. *Evolution (N. Y.)* 66, 3321–3335. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01684.x.
- Ellison, J., Li, X., Francke, U., and Shapiro, L. (1996). Rapid evolution of human pseudoautosomal genes and their mouse homologs. *Mamm. Genome* 7, 25–30. doi:10.1007/s003359900007.
- Endo, T., Romer, K. A., Anderson, E. L., Baltus, A. E., De Rooij, D. G., and Page, D. C. (2015). Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E2347–E2356. doi:10.1073/pnas.1505683112.
- Ernst, C., Odom, D. T., and Kutter, C. (2017). The emergence of piRNAs against transposon invasion to preserve mammalian genome integrity. *Nat. Commun.* 2017 81 8, 1–10. doi:10.1038/s41467-017-01049-7.
- Faria, R., Johannesson, K., Butlin, R. K., and Westram, A. M. (2019). Evolving Inversions. *Trends Ecol. Evol.* 34, 239–248. doi:10.1016/j.tree.2018.12.005.
- Faria, R., and Navarro, A. (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol. Evol.* 25, 660–669. doi:10.1016/j.tree.2010.07.008.
- Farré, M., Robinson, T. J., and Ruiz-Herrera, A. (2015). An integrative breakage model of genome architecture, reshuffling and evolution. *BioEssays* 37, 479–488. doi:10.1002/bies.201400174.
- Ferguson-Smith, M. A., and Trifonov, V. (2007). Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg2199.
- Filatov, D. A., and Gerrard, D. T. (2003). High mutation rates in human and ape pseudoautosomal genes. *Gene* 317, 67–77. doi:10.1016/S0378-1119(03)00697-8.
- Fine, A. D., Ball, R. L., Fujiwara, Y., Handel, M. A., and Carter, G. W. (2019). Uncoupling of transcriptomic and cytological differentiation in mouse spermatocytes with impaired meiosis. *Mol. Biol. Cell* 30, 717–728. doi:10.1091/MBE.E18-10-0681.
- Flaquer, A., Rappold, G. A., Wienker, T. F., and Fischer, C. (2008). The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 771–779. doi:10.1038/ejhg.2008.63.
- Forejt, J. (1979). Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouseII. Double

- heterozygotes for Robertsonian translocations. *Cytogenet. Genome Res.* 23, 163–170. doi:10.1159/000131322.
- Förster, D. W., Jones, E. P., Jóhannesdóttir, F., Gabriel, S. I., Giménez, M. D., Panithanarak, T., et al. (2016). Genetic differentiation within and away from the chromosomal rearrangements characterising hybridising chromosomal races of the western house mouse (*Mus musculus domesticus*). *Chromosom. Res.* 24, 271–280. doi:10.1007/s10577-016-9520-1.
- Galleni, L., Tellini, A., Cicalò, A., Fantini, C., and Fabiani, O. (1998). Histological examination of the male gonad of hybrid specimens: *Microtus savii* x *M. brachycercus* (Rodentia-Arvicolinae). *Bonner Zool. Beitrage*, 1–8.
- Garagna, S., Page, J., Fernandez-Donoso, R., Zuccotti, M., and Searle, J. B. (2014). The robertsonian phenomenon in the house mouse: mutation, meiosis and speciation. *Chromosoma* 123, 529–544. doi:10.1007/S00412-014-0477-6.
- Garagna, S., Zuccotti, M., Thornhill, A., Fernandez-Donoso, R., Berrios, S., Capanna, E., et al. (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J. Cell Sci.* 114, 4429–4434. doi:10.1242/JCS.114.24.4429.
- Gerrie, R., and Kennerley, R. (2016a). *Microtus evoronensis*. *IUCN Red List Threat. Species*, e.T13429A115112487. doi:10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13429A22350421.en.
- Gerrie, R., and Kennerley, R. (2016b). *Microtus mujanensis*. *IUCN Red List Threat. Species*, e.T13447A115113665. doi:10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T13447A22346397.en.
- Gheldof, A., MacKay, D. J. G., Cheong, Y., and Verpoest, W. (2019). Genetic diagnosis of subfertility: The impact of meiosis and maternal effects. *J. Med. Genet.* 56, 271–282. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105513.
- Gileva, E. A., Bolshakov, V. N., and Yalkovskaya, L. E. (2001). Voles of the *Microtus arvalis* group in zones of ecological risk: Interspecies hybridization. *Dokl. Biol. Sci.* 381, 567–569.
- Gold, H. B., Jung, Y. H., and Corces, V. G. (2018). Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome. *J. Biol. Chem.* 293, 13815–13820. doi:10.1074/jbc.R117.001561.
- Golenishchev, F., Malikov, V., Petrova, T., Bodrov, S., and Abramson, N. (2019). Toward assembling a taxonomic puzzle: Case study of Iranian gray voles of the subgenus *Microtus* (Rodentia, Cricetidae). *Mamm. Biol.* 94, 98–105. doi:10.1016/j.mambio.2018.06.007.
- Golenishssev, F. N., Malikov, V. G., Bulatova, N. S., Vaziri, A. S., and Nazari, F. (2000). *Some new data on morphology and karyology of Microtus kermanensis (rodentia, arvicolinae) and supposed phylogeographic history of the arvaloid voles.* , eds. A. K. Agadzhanian and V. N.

Orlov Moscow: Ross. Akad. Nauk.

- González, J. R., Cáceres, A., Esko, T., Cuscó, I., Puig, M., Esnaola, M., et al. (2014). A common 16p11.2 inversion underlies the joint susceptibility to asthma and obesity. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 361–372. doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.015.
- Good, J. M., Handel, M. A., and Nachman, M. W. (2007). Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution (N. Y.)* 62, 50–65. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00257.x.
- Graves, J. A. M. (2016). Did sex chromosome turnover promote divergence of the major mammal groups? *BioEssays* 38, 734–743. doi:10.1002/bies.201600019.
- Gregorova, S., Gergelits, V., Chvatalova, I., Bhattacharyya, T., Valiskova, B., Fotopulosova, V., et al. (2018). Modulation of PRDM9-controlled meiotic chromosome asynapsis overrides hybrid sterility in mice. *Elife* 7, e34282. doi:10.7554/eLife.34282.
- Guillon, H., Baudat, F., Grey, C., Liskay, R. M., and de Massy, B. (2005). Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol. Cell* 20, 563–573. doi:10.1016/j.molcel.2005.09.021.
- Haldane, J. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 2, 101–109.
- Hale, D. W., Washburn, L. L., and Eicher, E. M. (1993). Meiotic abnormalities in hybrid mice of the c57bl/6j x mus spretus cross suggest a cytogenetic basis for Haldane's rule of hybrid sterility. *Cytogenet. Genome Res.* 63, 221–234. doi:10.1159/000133539.
- Handel, M. (2004). The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp. Cell Res.* 296, 57–63. doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.008.
- Handel, M. A., and Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* 11, 124–136. doi:10.1038/nrg2723.
- Hao, S. L., Ni, F. Da, and Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 706, 201–210. doi:10.1016/j.gene.2019.05.027.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* 16, R203–R208. doi:10.1093/hmg/ddm243.
- Hauffe, H. C., and Searle, J. B. (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from Northern Italy. *Genetics* 150, 1143–1154. doi:10.1093/genetics/150.3.1143.
- Hedrick, P. W. (1981). The establishment of chromosomal variants. *Evolution (N. Y.)* 35, 322–

332. doi:10.1111/j.1558-5646.1981.tb04890.x.
- Helena Mangs, A., and Morris, B. (2007). The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Curr. Genomics* 8, 129–136. doi:10.2174/138920207780368141.
- Hess, R. A., and De Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 1–15. doi:10.1007/978-0-387-09597-4_1.
- Hima, K., Thiam, M., Catalan, J., Gauthier, P., Duplantier, J. M., Piry, S., et al. (2011). Extensive Robertsonian polymorphism in the African rodent *Gerbillus nigeriae*: geographic aspects and meiotic data. *J. Zool.* 284, 276–285. doi:10.1111/j.1469-7998.2011.00803.x.
- Hinch, A. G., Altemose, N., Noor, N., Donnelly, P., and Myers, S. R. (2014). Recombination in the human pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genet.* 10, e1004503. doi:10.1371/journal.pgen.1004503.
- Hogarth, C. A., Arnold, S., Kent, T., Mitchell, D., Isoherranen, N., and Griswold, M. D. (2015). Processive pulses of retinoic acid propel asynchronous and continuous murine sperm production. *Biol. Reprod.* 92, 37–38. doi:10.1095/biolreprod.114.126326.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res. (Camb)*. 5, 282–304.
- Horn, A., Basset, P., Yannic, G., Banaszek, A., Borodin, P. M., Bulatova, N. S., et al. (2012). Chromosomal rearrangements do not seem to affect the gene flow in hybrid zones between karyotypic races of the common shrew (*Sorex araneus*). *Evolution (N. Y)*. 66, 882–889. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01478.x.
- Howell, W. M., and Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015.
- Hunter, N. (2003). Synaptonemal complexities and commonalities. *Mol. Cell* 12, 533–535. doi:10.1016/S1097-2765(03)00361-7.
- Irie, S., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Ueda, T., Matsuoka, Y., Matsui, Y., et al. (2009). Single-nucleotide polymorphisms of the PRDM9 (MEISETZ) gene in patients with nonobstructive azoospermia. *J. Androl.* 30, 426–431. doi:10.2164/jandrol.108.006262.
- Ishishita, S., Tsuboi, K., Ohishi, N., Tsuchiya, K., and Matsuda, Y. (2015). Abnormal pairing of X and Y sex chromosomes during meiosis I in interspecific hybrids of *Phodopus campbelli* and *P. sungorus*. *Sci. Rep.* 5, 9435. doi:10.1038/srep09435.
- Iwamatsu, T., and Chang, M. C. (1972). Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.* 31, 237–247. doi:10.1530/jrf.0.0310237.

- Jiang, Y., Lucas, I., Young, D. J., Davis, E. M., Karrison, T., Rest, J. S., et al. (2009). Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4501–4512. doi:10.1093/hmg/ddp410.
- Kapun, M., and Flatt, T. (2019). The adaptive significance of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* 28, 1263–1282. doi:10.1111/mec.14871.
- Kartavtseva, I. V., Sheremetyeva, I. N., Korobitsina, K. V., Nemkova, G. A., Konovalova, E. V., Korablev, V. V., et al. (2008). Chromosomal forms of *Microtus maximowiczii* (Schrenck, 1859) (Rodentia, Cricetidae): variability in 2n and NF in different geographic regions. *Russ. J. Theriol.* 7, 89–97.
- Kartavtseva, I. V., Sheremetyeva, I. N., and Pavlenko, M. V. (2021a). Intraspecies multiple chromosomal variations including rare tandem fusion in the Russian Far Eastern endemic evoron vole *Alexandromys evoronensis* (Rodentia, Arvicolinae). *Comp. Cytogenet.* 15, 393. doi:10.3897/compcytogen.V15.I4.67112.
- Kartavtseva, I. V., Sheremetyeva, I. N., and Pavlenko, M. V. (2021b). multiple chromosomal polymorphism of “Evoron” chromosomal race of the Evoron vole (Rodentia, Arvicolinae). *Russ. J. Genet.* 57, 70–82. doi:10.1134/S1022795421010087.
- Kartavtseva, I. V., Vasilieva, T. V., Sheremetyeva, I. N., Lemskaya, N. A., Moroldoev, I. V., and Golenishchev, F. N. (2019). Genetic variability of three isolated populations of the Muya valley vole *Alexandromys mujanensis* Orlov et Kovalskaja, 1978 (Rodentia, Arvicolinae). *Russ. J. Genet.* 55, 978–992. doi:10.1134/S1022795419080076.
- Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P., Keeney, S., and Jasin, M. (2011). Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* 331, 916–920. doi:10.1126/science.1195774.
- Kauppi, L., Jasin, M., and Keeney, S. (2012). The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1267, 18–23. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06593.x.
- Keeney, S., Giroux, C. N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384. doi:10.1016/S0092-8674(00)81876-0.
- King, M. (1993). *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Kirkpatrick, M., and Barton, N. (2006). Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* 173, 419–34. doi:10.1534/genetics.105.047985.
- Kobayashi, Y., and Telschow, A. (2011). The concept of effective recombination rate and its application in speciation theory. *Evolution (N. Y.)* 65, 617–628. doi:10.1111/J.1558-5646.2010.01156.X.
- Kojima, M. L., De Rooij, D. G., and Page, D. C. (2019). Amplification of a broad transcriptional program by a common factor triggers the meiotic cell cycle in mice. *Elife* 8, e43738. doi:10.7554/eLife.43738.
- Kovalskaya, Y. M., Aniskin, V. M., Bogomolov, P. L., Surov, A. V, Tikhonov, I. A., Tikhonova, G. N., et al. (2011). Karyotype reorganisation in the subtilis group of birch mice (Rodentia, Dipodidae, Sicista): unexpected taxonomic diversity within a limited distribution. *Cytogenet. Genome Res.* 132, 271–88. doi:10.1159/000322823.
- Kryštufek, B., and Shenbrot, G. (2022). *Voles and Lemmings (Arvicolinae) of the Palaearctic Region*. Maribor: University of Maribor, University Press doi:10.18690/um.fnm.2.2022.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917. doi:10.1101/gad.1640708.
- Lanzone, C., Gimenez, M. D., Santos, J. L., and Bidau, C. J. (2007). Meiotic effects of Robertsonian translocations in tuco-tucos of the *Ctenomys perrensi* superspecies (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia* 60, 233. doi:10.1080/00087114.2007.10797942.
- Lardone, M. C., Reyes, I. N., Ortiz, E., Piottante, A., Palma, C., Ebersperger, M., et al. (2021). Testicular steroid sulfatase overexpression is associated with Leydig cell dysfunction in primary spermatogenic failure. *Andrology* 9, 657–664. doi:10.1111/andr.12950.
- Larson, E. L., Keeble, S., Vanderpool, D., Dean, M. D., and Good, J. M. (2016). The composite regulatory basis of the large X-effect in mouse speciation. *Mol. Biol. Evol.* 34, msw243. doi:10.1093/molbev/msw243.
- Lawrie, N. M., Tease, C., and Hulten, M. A. (1995). Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosomes. *Chromosoma* 104, 308–314. doi:10.1007/bf00352262.
- Lee, H. Y., Chou, J. Y., Cheong, L., Chang, N. H., Yang, S. Y., and Leu, J. Y. (2008). Incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes causes hybrid sterility between two yeast species. *Cell* 135, 1065–1073. doi:10.1016/j.cell.2008.10.047.

- Lemskaya, N. A., Kartavtseva, I. V., Rubtsova, N. V., Golenishchev, F. N., Sheremetyeva, I. N., and Graphodatsky, A. S. (2015). Chromosome polymorphism in *Microtus (Alexandromys) mujanensis* (Arvicolinae, Rodentia). *Cytogenet. Genome Res.* 146, 238–242. doi:10.1159/000439096.
- Lemskaya, N. A., Romanenko, S. A., Golenishchev, F. N., Rubtsova, N. V., Sablina, O. V., Serdukova, N. A., et al. (2010). Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). III. Karyotype relationships of ten *Microtus* species. *Chromosom. Res.* 18, 459–471. doi:10.1007/s10577-010-9124-0.
- Lesecque, Y., Glémin, S., Lartillot, N., Mouchiroud, D., and Duret, L. (2014). The red queen model of recombination hotspots evolution in the light of archaic and modern human genomes. *PLoS Genet.* 10, e1004790. doi:10.1371/journal.pgen.1004790.
- Li, X. C., Barringer, B. C., and Barbash, D. A. (2009). The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity (Edinb)*. 102, 24–30. doi:10.1038/hdy.2008.84.
- Liénard, M. A., Araripe, L. O., and Hartl, D. L. (2016). Neighboring genes for DNA-binding proteins rescue male sterility in *Drosophila* hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E4200–7. doi:10.1073/pnas.1608337113.
- Lin, Y., Gill, M. E., Koubova, J., and Page, D. C. (2008). Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science.* 322, 1685–1687. doi:10.1126/science.1166340.
- Lisachov, A. (2013). New method for visualization of C-heterochromatin in synaptonemal complex spreads. *Comp. Cytogenet.* 7, 131–8. doi:10.3897/CompCytogen.v7i2.5187.
- Lisovsky, A. A., Petrova, T. V., Yatsentyuk, S. P., Golenishchev, F. N., Putincev, N. I., Kartavtseva, I. V., et al. (2018). Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae). *Zool. Scr.* 47, 9–20. doi:10.1111/zsc.12261.
- MacGregor, G. R., Russell, L. D., Van Beek, M. E., Hanten, G. R., Kovac, M. J., Meistrich, M. L., et al. (1990). Symplastic spermatids (sys): a recessive insertional mutation in mice causing a defect in spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5016–20. doi:10.1073/pnas.87.13.5016.
- Mack, K., Campbell, P., and Nachman, M. (2016). Gene regulation and speciation in house mice. *Genome Res.* 26, 451–461. doi:10.1101/gr.195743.115.
- Mackintosh, A., Vila, R., Laetsch, D. R., Hayward, A., Martin, S. H., and Lohse, K. (2022).

- Chromosome fissions and fusions act as barriers to gene flow between *Brenthis fritillary* butterflies. *bioRxiv*. doi:10.1101/2022.10.30.514431.
- Maheshwari, S., and Barbash, D. A. (2011). The genetics of hybrid incompatibilities. *Annu. Rev. Genet.* 45, 331–355. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132514.
- Mahmoudi, A., Darvish, J., Aliabadian, M., Moghaddam, F. Y., and Kryštufek, B. (2017). New insight into the cradle of the grey voles (subgenus *Microtus*) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Mammalia*. doi:10.1515/mammalia-2016-0001.
- Mahmoudi, A., Zima, J., Kryštufek, B., Darvish, J., Aliabadian, M., and Arslan, A. (2018). Systematic relationships within the *Microtus arvalis* (Rodentia: Cricetidae) group in Iran, inferred from cytogenetic analyses. *Zool. Middle East* 64, 1–8. doi:10.1080/09397140.2017.1414957.
- Marshall, O. J., Chueh, A. C., Wong, L. H., and Choo, K. H. A. (2008). Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 261–282. doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.009.
- Mary, N., Barasc, H., Ferchaud, S., Billon, Y., Meslier, F., Robelin, D., et al. (2014). Meiotic recombination analyses of individual chromosomes in male domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS One* 9, e99123. doi:10.1371/journal.pone.0099123.
- Masly, J. P., and Presgraves, D. C. (2007). High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5, e243. doi:10.1371/journal.pbio.0050243.
- Massarini, A., Mizrahi, D., Tiranti, S., Toloza, A., Luna, F., and Schleich C E (2002). Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum talarum* from the atlantic coast of Buenos Aires province, Argentina (Rodentia: Octodontidae). *J. Neotrophils. Mammal* 9, 199–207.
- Matsuda, Y., Hirobe, T., and Chapman, V. (1991). Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4850–4.
- Matsuda, Y., Moens, P., and Chapman, V. (1992). Deficiency of X and Y chromosomal pairing at meiotic prophase in spermatocytes of sterile interspecific hybrids between laboratory mice (*Mus domesticus*) and *Mus spretus*. *Chromosoma* 101, 483–92.
- Matveevsky, S., Kolomiets, O., Bogdanov, A., Alpeeva, E., and Bakloushinskaya, I. (2020). Meiotic chromosome contacts as a plausible prelude for robertsonian translocations. *Genes (Basel)*. 11. doi:10.3390/genes11040386.
- Matveevsky, S., Kolomiets, O., Shchipanov, N., and Pavlova, S. (2023). Shrew evolution in hybrid zones: a meiotic undecavalent as an exclusive chromosomal supermultivalent and its weak

- effect on fertility. *bioRxiv*. doi:10.1101/2023.07.24.550268.
- Matveevsky, S. N., and Kolomiets, O. L. (2016). Synaptonemal complex configurations in Robertsonian heterozygotes. *Tsitologiya* 58, 309–314.
- Mazurok, N. A., Isaenko, A. A., Nesterova, T. B., and Zakian, S. M. (1996). High-resolution G-banding of chromosomes in the common vole *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolidae). *Hereditas* 124, 229–232. doi:10.1111/j.1601-5223.1996.00229.x.
- Mazurok, N. A., Rubtsova, N. V., Isaenko, A. A., Pavlova, M. E., Ya, S., Nesterova, T. B., et al. (2001). Comparative chromosome and mitochondrial DNA analyses and phylogenetic relationships within common voles (*Microtus*, Arvicolidae). *Chromosom. Res.* 9, 107–120.
- Medarde, N., Merico, V., López-Fuster, M. J., Zuccotti, M., Garagna, S., and Ventura, J. (2015). Impact of the number of Robertsonian chromosomes on germ cell death in wild male house mice. *Chromosom. Res.* 23, 159–169. doi:10.1007/s10577-014-9442-8.
- Mercer, S. J., Wallace, B. M., and Searle, J. B. (1992). Male common shrews (*Sorex araneus*) with long meiotic chain configurations can be fertile: implications for chromosomal models of speciation. *Cytogenet Cell Genet* 60, 68–73.
- Merico, V., Pigozzi, M. I., Esposito, A., Merani, M. S., and Garagna, S. (2003). Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 321–329. doi:10.1159/000076820.
- Meyer, M. N. (1994). “Hybridization. Breeding intensity,,” in *Common vole: sibling species*, eds. V. E. Sokolov and N. V. Bashenina (Nauka), 26–32.
- Meyer, M. N., Golenishchev, F. N., Radjably, S. I., and Sablina, O. V. (1996). *Voles (subgenus Microtus Schrank) of Russia and adjacent territories*. Sankt-Petersburg: Zoological Institute of RAS.
- Mihola, O., Pratto, F., Brick, K., Linhartova, E., Kobets, T., Flachs, P., et al. (2019). Histone methyltransferase PRDM9 is not essential for meiosis in male mice. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.244426.118.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J. C., and Forejt, J. (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science*. 323, 373-375.
- Miklos, G. L. G. (1974). Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet. Genome Res.* 13, 558–577. doi:10.1159/000130307.

- Miyamoto, T., Koh, E., Sakugawa, N., Sato, H., Hayashi, H., Namiki, M., et al. (2008). Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25, 553–557. doi:10.1007/S10815-008-9270-X.
- Moens, P. B., Chen, D. J., Shen, Z., Kolas, N., Tarsounas, M., Heng, H. H. Q., et al. (1997). Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* 106, 207–215. doi:10.1007/S004120050241.
- Mongin, E., Dewar, K., and Blanchette, M. (2009). Long-range regulation is a major driving force in maintaining genome integrity. *BMC Evol. Biol.* 9, 203. doi:10.1186/1471-2148-9-203.
- Morohoshi, A., Nakagawa, T., Nakano, S., Nagasawa, Y., and Nakayama, K. (2019). The ubiquitin ligase subunit β -TrCP in Sertoli cells is essential for spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* 445, 178–188. doi:10.1016/j.ydbio.2018.10.023.
- Moses, M. J., Poorman, P. A., Roderick, T. H., and Davisson, M. T. (1982). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84, 457–474. doi:10.1007/bf00292848.
- Moses, M. J., Slatton, G. H., Gambling, T. M., and Starmer, C. F. (1977). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) - III. Quantitative evaluation. *Chromosoma* 60, 345–375. doi:10.1007/bf00292859.
- Moyle, L. C., Muir, C. D., Han, M. V., and Hahn, M. W. (2010). The contribution of gene movement to the “two rules of speciation.” *Evolution (N. Y.)* 64, 1541–1557. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00990.x.
- Mukaj, A., Piálek, J., Fotopulosova, V., Morgan, A. P., Odenthal-Hesse, L., Parvanov, E. D., et al. (2020). Prdm9 interspecific interactions in hybrid male sterility of house mouse. *Mol. Biol. Evol.* 37, 3423–3438. doi:10.1093/molbev/msaa167.
- Muller, H. (1942). Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symp* 6, 71–125.
- Muñoz-Fuentes, V., Di Rienzo, A., and Vilà, C. (2011). Prdm9, a major determinant of meiotic recombination hotspots, is not functional in dogs and their wild relatives, wolves and coyotes. *PLoS One* 6, e25498. doi:10.1371/journal.pone.0025498.
- Musser, G. G., and Carleton, M. D. (2005). “Superfamily Muroidea,” in *Mammal Species of the World*, eds. D. E. Wilson and D. M. Reeder (Baltimore: The Johns Hopkins University Press), 894–1531.

- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R. E., Freeman, C., MacFie, T. S., et al. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science*. 327, 876-879.
- Nagaoka, S. I., Hassold, T. J., and Hunt, P. A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* 13, 493–504. doi:10.1038/nrg3245.
- Narasimhan, V. M., Hunt, K. A., Mason, D., Baker, C. L., Karczewski, K. J., Barnes, M. R., et al. (2016). Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. *Science*. 352, 474–477. doi:10.1126/science.aac8624.
- Neumann, K., Michaux, J., Lebedev, V., Yigit, N., Colak, E., Ivanova, N., et al. (2006). Molecular phylogeny of the Cricetinae subfamily based on the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes and the nuclear vWF gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 135–48. doi:10.1016/j.ympev.2006.01.010.
- Nevo, E., Filippucci, M. G., Redi, C., Korol, A., and Beiles, A. (1994). Chromosomal speciation and adaptive radiation of mole rats in Asia Minor correlated with increased ecological stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91, 8160–8164.
- Nishino, R., Petri, S., Handel, M. A., Kunieda, T., and Fujiwara, Y. (2018). Hybrid sterility with meiotic metaphase arrest in intersubspecific mouse crosses. *J. Hered.* doi:10.1093/jhered/esy060.
- Noor, M. A., Grams, K. L., Bertucci, L. A., and Reiland, J. (2001). Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12084–8. doi:10.1073/pnas.221274498.
- O'Brien, S., Menninger, J., and Nash, W. (2006). *Atlas of mammalian chromosomes*. John Wiley & Sons.
- Odorisio, T., Rodriguez, T. A., Evans, E. P., Clarke, A. R., and Burgoyne, P. S. (1998). The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 18, 257–261.
- Oka, A., Mita, A., Takada, Y., Koseki, H., and Shiroishi, T. (2010). Reproductive isolation in hybrid mice due to spermatogenesis defects at three meiotic stages. *Genetics* 186, 339–351. doi:10.1534/genetics.110.118976.
- Oliver, P. L., Goodstadt, L., Bayes, J. J., Birtle, Z., Roach, K. C., Phadnis, N., et al. (2009). Accelerated evolution of the Prdm9 speciation gene across diverse Metazoan taxa. *PLoS Genet.* 5, e1000753. doi:10.1371/journal.pgen.1000753.

- Orlov, V. N., and Kovalskaya, Y. M. (1978). *Microtus mujanensis* sp. n. from the Vitim River Basin. *Zool. Zhurnal* 57, 1224–1232.
- Otto, S. P., Pannell, J. R., Peichel, C. L., Ashman, T.-L., Charlesworth, D., Chippindale, A. K., et al. (2011). About PAR: The distinct evolutionary dynamics of the pseudoautosomal region. *Trends Genet.* 27, 358–367. doi:10.1016/J.TIG.2011.05.001.
- Owen, J. G., and Baker, R. J. (2001). The *Uroderma Bipolatum* (Chiroptera: Phyllostomidae) cline revisited. *J. Mammal.* 82, 1102–1113.
- Page, S. L., and Hawley, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785–9. doi:10.1126/science.1086605.
- Palmer, S., Perry, J., Kipling, D., and Ashworth, A. (1997). A gene spans the pseudoautosomal boundary in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12030–5. doi:10.1073/pnas.94.22.12030.
- Parvanov, E., Petkov, P., and Paigen, K. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science.* 327, 835–835. doi:10.1126/science.1181495.
- Perry, J., and Ashworth, A. (1999). Evolutionary rate of a gene affected by chromosomal position. *Curr. Biol.* 9, 987-S3. doi:10.1016/S0960-9822(99)80430-8.
- Peters, A. H. F. M., Plug, A. W., van Vugt, M. J., and Boer, P. de (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosom. Res.* 5, 66–68. doi:10.1023/A:1018445520117.
- Phadnis, N., and Orr, H. A. (2009). A single gene causes both male sterility and segregation distortion in *Drosophila* hybrids. *Science* 323, 376–9. doi:10.1126/science.1163934.
- Poikela, N., Laetsch, D., Lohse, K., and Kankare, M. (2022). Speciation driven by ancestrally polymorphic chromosomal inversions. doi:10.1101/2022.11.15.516589.
- Polani, P. E. (1972). Centromere localization at meiosis and the position of chiasmata in the male and female mouse. *Chromosoma* 36, 343–374. doi:10.1007/BF00336793.
- Poorman, P. A., Moses, M. J., Davisson, M. T., and Roderick, T. H. (1981). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements - III. Cytogenetic observations on two paracentric inversions. *Chromosoma* 83, 419–429. doi:10.1007/bf00327363.
- Powers, N. R., Dumont, B. L., Emori, C., Lawal, R. A., Brunton, C., Paigen, K., et al. (2020). Sexual dimorphism in the meiotic requirement for PRDM9: A mammalian evolutionary safeguard. *Sci. Adv.* 6. doi:10.1126/sciadv.abb6606.
- Powers, N. R., Parvanov, E. D., Baker, C. L., Walker, M., Petkov, P. M., and Paigen, K. (2016).

- The meiotic recombination activator PRDM9 trimethylates both H3K36 and H3K4 at recombination hotspots in vivo. *PLOS Genet.* 12. doi:10.1371/journal.pgen.1006146.
- Prothero, K. E., Stahl, J. M., and Carrel, L. (2009). Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two. *Chromosom. Res.* 17, 637–648. doi:10.1007/s10577-009-9063-9.
- R Core Team (2019). A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Raicu, P., Kirillova, M., and Hamar, M. (1969). A new chromosomal sex-determining mechanism in *Microtus arvalis pallas*. *Genetica* 40, 97–102. doi:10.1007/bf01787343.
- Raman, R., and Das, P. (1991). Mammalian sex chromosomes III. Activity of pseudoautosomal steroid sulfatase enzyme during spermatogenesis in *Mus musculus*. *Somat. Cell Mol. Genet.* 17, 429–433. doi:10.1007/bf01233166.
- Raudsepp, T., and Chowdhary, B. P. (2016). The eutherian pseudoautosomal region. *Cytogenet. Genome Res.* 147, 81–94. doi:10.1159/000443157.
- Redi, C. A., Garagna, S., Hilscher, B., and Winking, H. (1985). The effects of some Robertsonian chromosome combinations on the seminiferous epithelium of the mouse. *Development* 85, 1–20. doi:10.1242/DEV.85.1.1.
- Reeves, A. (2001). MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44, 439–443. doi:10.1139/g01-037.
- Ribagorda, M., Berríos, S., Solano, E., Ayarza, E., Martín-Ruiz, M., Gil-Fernández, A., et al. (2019). Meiotic behavior of a complex hexavalent in heterozygous mice for Robertsonian translocations: insights for synapsis dynamics. *Chromosoma* 128, 149–163. doi:10.1007/S00412-019-00695-8.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16, 351–358. doi:10.1016/S0169-5347(01)02187-5.
- Rodriguez, T. A., and Burgoyne, P. S. (2000). Evidence that sex chromosome asynapsis, rather than excess Y gene dosage, is responsible for the meiotic impairment of XYY mice. *Cytogenet Cell Genet* 89, 38–43.
- Rogatcheva, M. B., Oda, S.-I., Axenovich, T. I., Aulchenko, Y. S., Searle, J. B., and Borodin, P. M. (1998). Chromosomal segregation and fertility in Robertsonian chromosomal heterozygotes of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Heredity (Edinb)*. 81, 335–341. doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00394.x.

- Romanenko, S., Perelman, P., Serdukova, N., Trifonov, V., Biltueva, L., Wang, J., et al. (2006). Reciprocal chromosome painting between three laboratory rodent species. *Mamm. Genome* 17, 1183–1192. doi:10.1007/s00335-006-0081-z.
- Romanenko, S., Volobouev, V., Perelman, P., Lebedev, V., Serdukova, N., Trifonov, V., et al. (2007). Karyotype evolution and phylogenetic relationships of hamsters (Cricetidae, Muroidea, Rodentia) inferred from chromosomal painting and banding comparison. *Chromosome Res.* 15, 283–97. doi:10.1007/s10577-007-1124-3.
- Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434, 325–337. doi:10.1038/nature03440.
- Royo, H., Polikiewicz, G., Mahadevaiah, S. K., Prosser, H., Mitchell, M., Bradley, A., et al. (2010). Evidence that Meiotic Sex Chromosome Inactivation Is Essential for Male Fertility. *Curr. Biol.* 20, 2117–2123. doi:10.1016/j.cub.2010.11.010.
- Ruiz-Herrera, A., Castresana, J., and Robinson, T. J. (2006). Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biol.* 7, R115. doi:10.1186/gb-2006-7-12-r115.
- Ruiz-Herrera, A., and Robinson, T. J. (2007). Chromosomal instability in Afrotheria: fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genome sequence assemblies. *BMC Evol. Biol.* 7, 199. doi:10.1186/1471-2148-7-199.
- Rumpler, Y. (1993). Double heterozygosity of chromosomal inversion in mice: a key to speciation. *Arch Anat Histol Embryol* 75, 101–110.
- Rumpler, Y., and Dutrillaux, B. (1976). Chromosomal evolution in Malagasy lemurs. I. Chromosome banding studies in the genera Lemur and Microcebus. *Cytogenet. Cell Genet.* 17, 268–81. doi:10.1159/000130722.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., and Clegg, E. D. (1993). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Int. J. Androl.* 16, 83–83. doi:10.1111/J.1365-2605.1993.TB01156.X.
- Safronova, L. D., Cherepanova, E. V., and Vasil'eva, N. Y. (1999). Specific features of the first meiotic division in hamster hybrids obtained by backcrossing *Phodopus sungorus* and *Phodopus campbelli*. *Dokl. Biol. Sci.* 35, 184–188.
- Safronova, L. D., Golenishchev, F. N., Cherepanova, E. V., and Baskevich, M. I. (2011). Meiosis in gray voles of the subgenus *Microtus* (Rodentia, Arvicolinae) and in their hybrids. *Russ. J.*

- Genet.* 47, 857–863. doi:10.1134/S1022795411040107.
- Safronova, L., Malygin, V., Levenkova, E., and Orlov, V. (1992). Cytogenetic results of hybridization of hamsters *Rhodopus sungorus* and *Phodopus campbelli*. *Dokl. Akad. Nauk* 327, 266–71.
- Sans-Fuentes, M. A., Garsia-Valero, J., Ventura, J., and Lopez-Fuster, M. J. (2010). Spermatogenesis in house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction* 140, 569–581. doi:https://doi.org/10.1530/rep-10-0237.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 621–627. doi:10.1038/35085086.
- Schmid, M., Haaf, T., Weis, H., and Schempp, W. (1986). Chromosomal homologies in hamster species of the genus *Phodopus* (Rodentia, Cricetinae). *Cytogenet. Genome Res.* 43, 168–173. doi:10.1159/000132316.
- Schwahn, D. J., Wang, R. J., White, M. A., and Payseur, B. A. (2018). Genetic dissection of hybrid male sterility across stages of spermatogenesis. *Genetics* 210, 1453–1465. doi:doi.org/10.1534/genetics.118.301658.
- Schwander, T., Libbrecht, R., and Keller, L. (2014). Supergenes and complex phenotypes. *Curr. Biol.* 24, R288–R294. doi:10.1016/j.cub.2014.01.056.
- Segura, J., Ferretti, L., Ramos-Onsins, S., Capilla, L., Farré, M., Reis, F., et al. (2013). Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 1945. doi:10.1098/rspb.2013.1945.
- Skinner, M., and Grisworld, M. (2005). *Sertoli Cell Biology*. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Smagulova, F., Brick, K., Pu, Y., Camerini-Otero, R. D., and Petukhova, G. V. (2016). The evolutionary turnover of recombination hot spots contributes to speciation in mice. *Genes Dev.* 30, 266–280. doi:10.1101/gad.270009.115.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., and Fishel, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* 15, 437–451. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.040.
- Sokolov, V. E., and Vasil'eva, N. Y. (1993). Hybridological analysis confirms the species specificity of *Phodopus sungorus* (Pallas, 1773) and *Phodopus campbelli* (Thomas, 1905). *Dokl. Biol. Sci.* 332, 120–123.

- Soriano, P., Keitges, E., Schorderet, D., Harbers, K., Gartler, S., and Jaenisch, R. (1987). High rate of recombination and double crossovers in the mouse pseudoautosomal region during male meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7218–20.
- Stack, S. M. (1984). Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J. Cell Sci.* 71, 159–176. doi:10.1242/jcs.71.1.159.
- Stankowski, S., and Ravinet, M. (2021). Defining the speciation continuum. *Evolution (N. Y.)* 75, 1256–1273. doi:10.1111/evo.14215.
- Sun, F., Fujiwara, Y., Reinholdt, L. G., Hu, J., Saxl, R. L., Baker, C. L., et al. (2015). Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modifications and homologous synapsis. *Chromosoma* 124, 397–415. doi:10.1007/s00412-015-0511-3.
- Sun, F., Mikhaail-Philips, M., Oliver-Bonet, M., Ko, E., Rademaker, A., Turek, P., et al. (2008). Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 399–404. doi:10.1093/molehr/gan030.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R. E., and Moens, P. B. (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J. Cell Biol.* 147, 207–20. doi:10.1083/jcb.147.2.207.
- Torgasheva, A. A., Basheva, E. A., Gomez Fernandez, M. J., Mirol, P., and Borodin, P. M. (2016). Chromosomes and speciation in tuco-tuco (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia). *Vavilov J. Genet. Breed.* 20, 408–415. doi:10.18699/VJ16.170.
- Torgasheva, A. A., and Borodin, P. M. (2010). Synapsis and recombination in inversion heterozygotes. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1676. doi:10.1042/bst0381676.
- Torgasheva, A. A., and Borodin, P. M. (2016). Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis*. *Sci. Rep.* 6, 36564. doi:10.1038/srep36564.
- Torgasheva, A. A., Rubtsov, N. B., and Borodin, P. M. (2013). Recombination and synaptic adjustment in oocytes of mice heterozygous for a large paracentric inversion. *Chromosome Res.* 21, 37–48. doi:10.1007/s10577-012-9336-6.
- Turner, J. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823–1831. doi:10.1242/dev.000018.
- Turner, J., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G. V. R., et al. (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation.

- Curr. Biol.* 14, 2135–2142. doi:10.1016/j.cub.2004.11.032.
- Turner, J. M. A. (2015). Meiotic silencing in Mammals. *Annu. Rev. Genet.* 49, 395–412. doi:10.1146/annurev-genet-112414-055145.
- Turner, J., Mahadevaiah, S., Ellis, P., Mitchell, M., and Burgoyne, P. (2006). Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev. Cell* 10, 521–9. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.009.
- Turner, J., Mahadevaiah, S., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., et al. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* 37, 41–7. doi:10.1038/ng1484.
- Van Tuinen, P., Mootnick, A. R., Kingswood, S. C., Hale, D. W., and Kumamoto, A. T. (1999). Complex, compound inversion/translocation polymorphism in an ape: Presumptive intermediate stage in the karyotypic evolution of the agile gibbon *Hylobates agilis*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 110, 129–142.
- Vistorin, G., Gamperl, R., and Rosenkranz, W. (1977). Studies on sex chromosomes of four hamster species: *Cricetus cricetus*, *Cricetulus griseus*, *Mesocricetus auratus*, and *Phodopus sungorus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 18, 24–32.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B., and Everett, C. A. (2002). The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenet. Genome Res.* 96, 276–286. doi:10.1159/000063054.
- Ward, I. M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–62. doi:10.1074/jbc.C100569200.
- Waters, P. D., and Ruiz-Herrera, A. (2020). Meiotic executioner genes protect the Y from extinction. *Trends Genet.* 36, 728–738. doi:10.1016/j.tig.2020.06.008.
- Western, P. S., Miles, D. C., van den Bergen, J. A., Burton, M., and Sinclair, A. H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 339–347. doi:10.1634/stemcells.2007-0622.
- White, M. (1978). *Modes of speciation*. San Francisco: W.H. Freeman.
- White, M. A., Steffy, B., Wiltshire, T., and Payseur, B. A. (2011). Genetic dissection of a key reproductive barrier between nascent species of house mice. *Genetics* 189, 289–304. doi:10.1534/genetics.111.129171.

- White, M., Stubbings, M., Dumont, B., and Payseur, B. (2012). Genetics and evolution of hybrid male sterility in house mice. *Genetics* 191, 917–934. doi:10.1534/genetics.112.140251.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wu, C. I., and Davis, A. W. (1993). Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am. Nat.* 142, 187–212. doi:10.1086/285534.
- Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R. A., et al. (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: An in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol. Reprod.* 79, 35–42. doi:10.1095/biolreprod.107.066795.
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., et al. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2681–2695. doi:10.1007/s00018-019-03101-9.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33, 603–754. doi:10.1146/annurev.genet.33.1.603.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016626. doi:10.1101/cshperspect.a016626.
- Zong, E., and Fan, G. (1989). The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity (Edinb)*. 62, 393–406. doi:10.1038/hdy.1989.54.