

На правах рукописи

БИКЧУРИНА ТАТЬЯНА ИГОРЕВНА

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

1.5.7. – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» и лаборатории структурно-функциональной организации генома ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск

Научный руководитель:

Бородин Павел Михайлович

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа, ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Родионов Александр Викентьевич

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии ФГБУН Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

Проскурякова Анастасия Андреевна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики животных, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение:

ФГБУН Зоологический институт РАН
г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» ноября 2023 г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <https://www.icgbio.ru>

Автореферат разослан «__» сентября 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 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 исследования. 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 полевок *A. taximowiczii*, *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 полевок 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 полевок соотносится с времени 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.

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.

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 ЕСС (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 диссертации. 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе были использованы взрослые половозрелые самцы и новорожденные самки. 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.

Гистологический анализ. Гонады выделяли сразу после эвтаназии. Фиксация в формалине, заключение в парафин, приготовление и окрашивание гематоксилин-эозином срезов толщиной 5 мкм проводилось согласно стандартной методике (Ahmed and de Rooij, 2009). Клетки сперматогенного эпителия на поперечных срезах семенников были определены согласно соответствующим описаниям на мышах (Russell et al., 1993). Соотношение сперматид и сперматоцитов I оценивали в случайно выбранных канальцах на стадиях VI-VIII.

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 (рН 8). Фрагментированную ДНК клеток, погибших путем апоптоза, детектировали с помощью опосредованного терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазой дезоксиуридинтрифосфатного мечения концов (TUNEL) с использованием набора реактивов DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega). Стекла со срезами покрывали раствором с реагентом, снижающим интенсивность выгорания препарата (Vectashield или Vectashield with DAPI, Vector Laboratories).

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). Иммуноокрашивание проводилось согласно стандартному протоколу (Anderson et al., 1999). 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) 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). После иммуноокрашивания препараты покрывали раствором с реагентом, снижающим интенсивность выгорания препарата (Vectashield, Vector Laboratories). Для анализа мы выбирали клетки на стадии средней-поздней пахитены, если остановка мейоза не наблюдалась на более ранних стадиях.

Микроскопический анализ и обработка изображений.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. 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), а также на микроскопе Axioscop 2 plus (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенный камерой CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss) и пакетом обработки изображений AxioVision (Carl Zeiss).

Статистический анализ. В ходе иммунофлуоресцентного анализа использовали клетки с неповрежденным СК; учитывали только расположенные на СК сигналы MLH1. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета R (v4.1.3) (R Core Team, 2019). В ходе статистических операций мы использовали: попарный критерий Вилкоксона с поправкой Бенджамини-Хохберга, однопропорциональный z-критерий, t-тест Стьюдента и t-test Велча с поправкой Бонферрони, где необходимо. На выбор критерия влияли размер выборки и особенности характеристик распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1 Гибридная стерильность у представителей рода *Alexandromys*. 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. 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.

В качестве модели для изучения формирования гибридной стерильности между видами с сильной кариотипической дивергенцией мы использовали внутривидовых гибридов между хромосомными расами вида *A. evoronensis* и межвидовых гибридов прямого и обратного направлений скрещиваний полевок *A. evoronensis*, *A. tujanensis* и *A. maximowiczii*. Эти виды характеризуются высоким уровнем хромосомного полиморфизма (Kartavtseva et al., 2008; Lemskaya et al., 2015; Kartavtseva et al., 2021a, 2021b). Время дивергенции между этими тремя видами оценивается примерно в 110 тыс. лет (Bannikova et al., 2019). Было показано, что их межвидовые гибриды обоих полов стерильны (Meyer et al., 1996).

1.1 Гистологический анализ гибридов рода *Alexandromys*. Для оценки степени нарушения гаметогенеза мы провели гистологическое исследование гонад межвидовых гибридов, гибридов между разными популяциями и хромосомными расами одного вида, в сравнении с гонадами особей родительских видов.

Гистологический анализ выявил нормальное строение семенников у всех представителей родительских видов, межпопуляционных гибридов между потомками двух популяций *A. evoronensis* «Арги» и двух из трех межрасовых гибридов *A. evoronensis* «Арги» х *A. evoronensis* «Эворон» (Рис. 1А, Г). У одного гибрида *A. evoronensis* «Арги» х *A. evoronensis* «Эворон» сперматогенез проходил только до стадии ранних сперматоцитов.

У всех межвидовых гибридов *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* и *A. evoronensis* была выявлена различная степень нарушения сперматогенеза. Так, в некоторых канальцах *A. tujanensis* х *A. maximowiczii* мы наблюдали небольшое число сперматид и незрелых сперматозоидов (Рис. 1Б). Круглые сперматиды были одиночными или агрегированы в многоядерные синцитиальные элементы разного размера. В других канальцах сперматогенез останавливался на стадии пахитены (Рис. 1Д). Отношение сперматид к сперматоцитам I было значительно снижено (1.35: 1) по сравнению с наблюдаемым у самцов родительских видов (попарный тест Вилкоксона, $P=4.7*10^{-8}$). Схожая прогрессия сперматогенеза наблюдалась у одного гибрида *A. evoronensis* «Арги» х *A. tujanensis* и двух гибридов *A. evoronensis* «Арги» х *A. maximowiczii*. 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, $P=7,9*10^{-14}$). У всех остальных межвидовых гибридов сперматогенез останавливался преимущественно на стадии пахитены, с последующей гибелью сперматоцитов (Рис. 1В, Е).

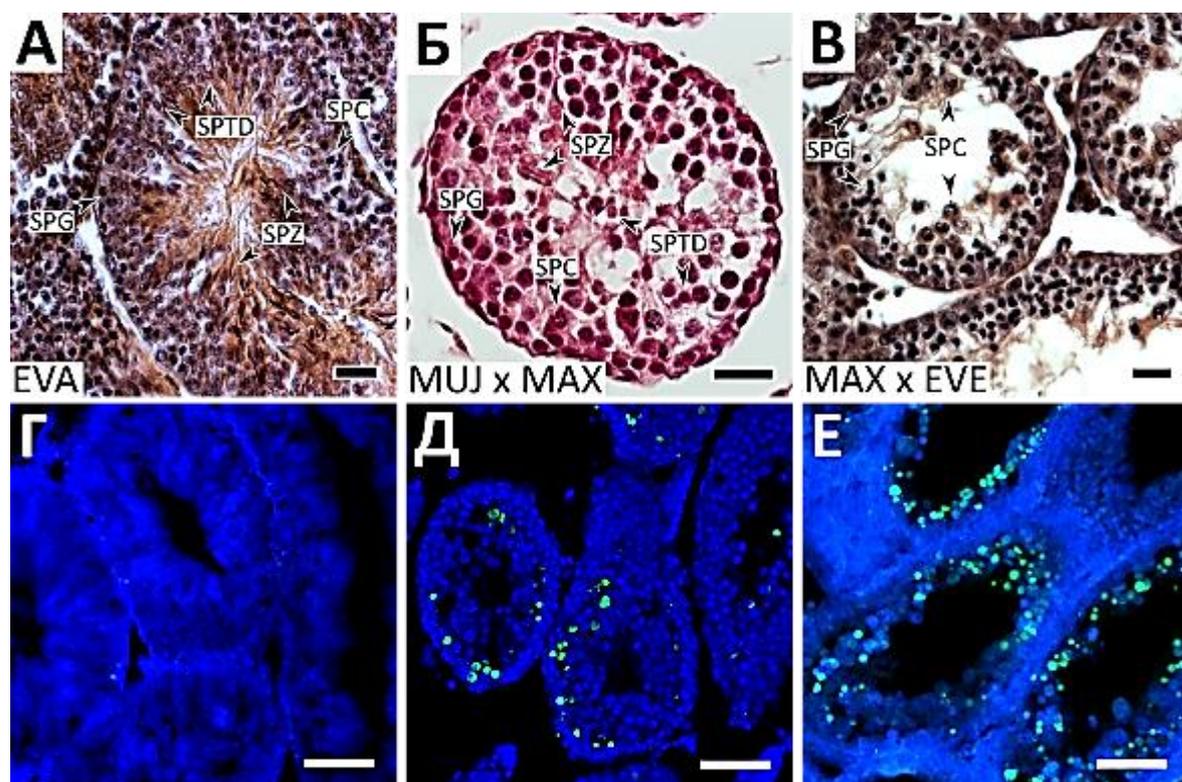


Рисунок 1. Гистологические срезы семенных канальцев *A. evoronensis* «Арги» (А, Г), *A. tujanensis* x *A. maximowiczii* (Б, Д) и *A. maximowiczii* x *A. evoronensis* «Эворон» (В, Е). Первая строка: окрашивание гематоксилин-эозином. Вторая строка: окрашивание методом TUNEL. Синий – DAPI, зеленый – TUNEL. SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм.

1.2 Цитогенетический анализ гибридов рода *Alexandromys*. 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. Внутривидовые гибриды были простыми гетерозиготами по нескольким перестройкам, их клетки содержали гетероморфные биваленты или триваленты. Межвидовые гибриды являлись сложными гетерозиготами по многим перестройкам. Известно, что у сложных гетерозигот в ходе гомологичного синапсиса могут образовываться мультиваленты в форме цепочек или колец (Matveevsky and Kolomiets, 2016; Belonogova et al., 2017; Borodin et al., 2019).

У самцов родительских видов, а также у внутривидовых гибридов между представителями популяций *A. evoronensis* «Арги» и гибридов между представителями хромосомных рас *A. evoronensis* «Арги» и *A. evoronensis* «Эворон» мы не наблюдали нарушения синапсиса и рекомбинации гомологичных хромосом, которые оказывали бы влияние на прохождение мейоза (Рис. 2А, Б, Д, Е).

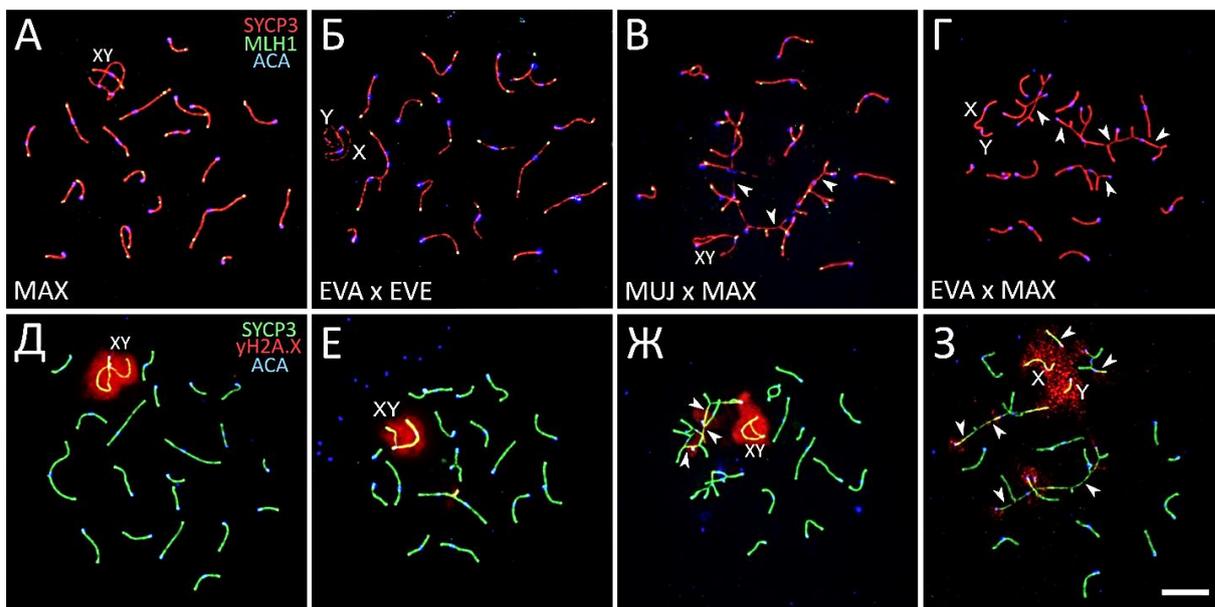


Рисунок 2. Сперматоциты полевок и их внутри- и межвидовых гибридов на стадии пахитены после иммуноокрашивания MLH1 (верхняя строка) и γ H2A.X (нижняя строка). Первый столбец: родительский вид *A. maximowiczii* (А, Д). Второй столбец: внутривидовые гибриды *A. evoronensis* «Арги» x *A. evoronensis* «Эворон» (Б, Е). Третий столбец: межвидовые гибриды *A. mujanensis* x *A. maximowiczii* (В, Ж). Четвертый столбец: межвидовые гибриды *A. evoronensis* «Арги» x *A. maximowiczii* (Г, З). Стрелки указывают на асинаптированные районы аутосом. Масштаб: 10 мкм.

У внутривидовых гибридов *A. evoronensis* мы описали серию синаптических конфигураций, возникших как результат внутри- и межпопуляционного полиморфизма по межплечевым транслокациям, перичентрическим инверсиям или центромерным сдвигам. Так, у межпопуляционных гибридных самцов *A. evoronensis* «Арги» в клетках находились 3-4 гетероморфных бивалента с невыровненными центромерами. В клетках самцов межрасовых гибридов *A. evoronensis* «Арги» x «Эворон» мы наблюдали 1-2 бивалента с невыровненными центромерами и 4 тривалента с ярко выраженными боковыми плечами. В клетках на стадии ранней пахитены в районах частичного асинапсиса в прицентромерных областях тривалентов мы детектировали сигнал γ H2A.X. Сигнал пропадал к стадии поздней пахитены (Рис. 2Е), что свидетельствует об успешном завершении синаптической подгонки и репарации двунитевых разрывов.

Мы обнаружили значительные aberrации хромосомного синапсиса у всех межвидовых гибридов. У самца *A. mujanensis* x *A. maximowiczii* униваленты аутосом встречались редко, хромосомы были объединены в гомоморфные и гетероморфные биваленты, триваленты и мультиваленты, состоящие из 4-17 элементов (Рис. 2В, Г). Небольшое число асинаптированных областей СК несло сигнал γ H2A.X (Рис. 2Ж). Уровень рекомбинации не был снижен в сравнении с *A. mujanensis* (тест Велча, $P=0,073$).

У самцов гибридов *A. evoronensis* с *A. mujanensis* и *A. maximowiczii* в клетках наблюдались все вышеперечисленные синаптические конфигурации, но с более выраженным подавлением синапсиса и рекомбинации (Рис. 2Г, З). Только у

одного самца *A. evoronensis* «Арги» х *A. maximowiczii* в пахитенных сперматоцитах были детектированы сигналы MLH1, при этом их число на клетку не отличалось от родительских видов (тест Велча, $P > 0,1$).

2 Гибридная стерильность у представителей рода *Microtus*. 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 гаметы 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 рода *Microtus* подрода *Microtus*. Время дивергенции родительских видов полевков *Microtus* составляет около 150-250 тысяч лет (Mahmoudi et al., 2017; Golenishchev et al., 2019). Кариотипы *M. arvalis* «obscurus» и *M. rossiaemeridionalis* различаются 14 крупными хромосомными перестройками, тогда как кариотипы более далеких видов *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis* различаются 8 перестройками, 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).

2.1 Гистологический анализ гибридов рода *Microtus*. С помощью тестовых скрещиваний было показано, что межвидовые самцы гибриды *Microtus* стерильны, но самки гибридов скрещиваний между *M. rossiaemeridionalis*, *M. kermanensis* и *M. mystacinus* фертильны (Golenishchev 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. Мы не обнаружили аномалий в строении семенников и в клеточном цикле сперматогенного эпителия у всех родительских видов (Рис. 3А, Б).

Самым распространенным нарушением среди гибридов близких видов *M. kermanensis*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* был арест сперматогенеза на стадии сперматид, с частичной остановкой мейоза, при этом в канальцах часто наблюдались сперматиды, агрегированные в многоядерные синцитиальные элементы (Рис. 3В). У гибридов прямого и обратного скрещивания *M. kermanensis* х *M. rossiaemeridionalis* были выявлены различные нарушения сперматогенеза: от его полной остановки на стадии сперматогоний до практически нормального сперматогенеза с продукцией зрелых, но аномальных сперматозоидов. У гибридов *M. kermanensis* х *M. mystacinus* сперматогенез проходил до стадии сперматид, тогда как у гибридов обратного направления остановка сперматогенеза происходила на стадии от формирования аномальных сперматозоидов до сперматоцитов I также, как и у *M. mystacinus* х *M. rossiaemeridionalis*. У гибридов *M. rossiaemeridionalis* х *M. mystacinus* сперматогенез останавливался на стадии сперматоцитов I (Рис. 3Г). В канальцах, где наблюдалась остановка сперматогенеза на стадии мейоцитов были

детектированы TUNEL-положительные клетки, при этом число таких канальцев варьировало у разных особей (Рис. 3Д).

Мейотический арест 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. У гибридов наблюдался избыток первичных сперматоцитов в некоторых канальцах (Рис. 3Е) вместе с выраженным 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, $P=6.6 \cdot 10^{-5}$).

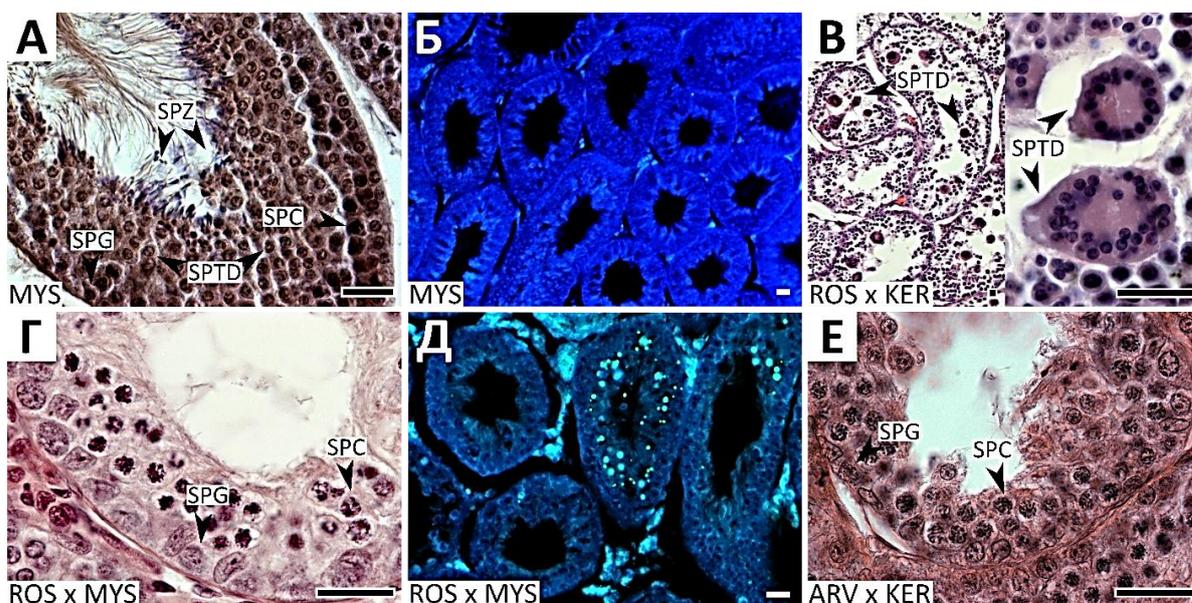


Рисунок 3. Гистологические срезы семенных канальцев *M. mystacinus* (А, Б), *M. rossiaemeridionalis* x *M. kermanensis* (В), *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* (Г, Д) и *M. arvalis* x *M. kermanensis* (Е). Первый и третий столбцы: окрашивание гематоксилин-эозином. Второй столбец: окрашивание методом TUNEL. Синий – DAPI, зеленый – TUNEL. SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм.

2.2 Цитогенетический анализ гибридов рода *Microtus*.

У особей родительских видов *M. kermanensis*, *M. mystacinus*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. transcaspicus* и *M. arvalis* «arvalis» мы не наблюдали нарушения синапсиса и рекомбинации хромосом. Половые хромосомы были локализованы совместно и образовывали половое тельце, однако были полностью асинаптированы, что является единственным вариантом нормы для этих видов (Borodin et al., 2012) (Рис. 4А, Д).

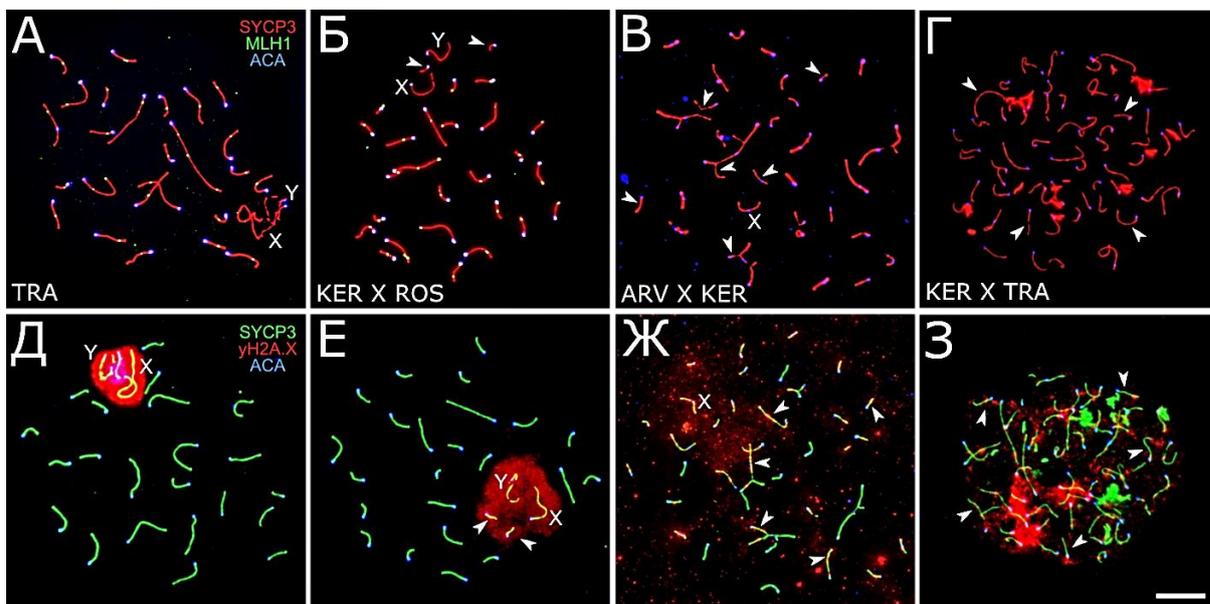


Рисунок 4. Сперматоциты полевок и их межвидовых гибридов на разных стадиях профазы I после иммуноокрашивания MLH1 (верхняя строка) и γ H2A.X (нижняя строка). Первый столбец: клетки на стадии пахитены родительского вида *M. transcaspicus* (А, Д). Второй столбец: клетки на стадии пахитены межвидовых гибридов с идентичными кариотипами родительских видов *M. kermanensis* x *M. rossiaemeridionalis* (Б, Е). Третий столбец: клетки на стадии зиготены межвидовых гибридов с различными кариотипами родительских видов *M. arvalis* x *M. kermanensis* (В, Ж). Четвертый столбец: клетки на стадии лептотены межвидовых гибридов с различными кариотипами родительских видов *M. kermanensis* x *M. transcaspicus* (Г, З). Стрелки указывают на асинапированные районы аутосом. Масштаб: 10 мкм.

У гибридов между *M. rossiaemeridionalis* и *M. kermanensis* были обнаружены нарушения синапсиса хромосом. Большинство пахитенных сперматоцитов гибридов содержали полностью синаптированные аутосомы. В 12,7% клеток находилось до шести небольших по размеру аутосомных унивентов, которые активно метились антителами к γ H2A.X, что указывает на транскрипционный сайленсинг асинаптированного хроматина (Рис. 4 Б, Е). Число сигналов MLH1 на клетку не было снижено у самцов гибридов по сравнению с родительским видом *M. rossiaemeridionalis* (тест Велча, $P=0,11$).

Процент клеток с полностью завершенным синапсисом аутосом варьировал от 30% до 90% у гибридов *M. kermanensis* x *M. mystacinus* и от 0% до 76% у гибридов *M. mystacinus* x *M. kermanensis*. Среднее число сайтов MLH1 у гибридов *M. kermanensis* x *M. mystacinus* значительно отличалось от родительских видов, однако у гибрида *M. mystacinus* x *M. kermanensis* было сравнимо с *M. kermanensis* (тест Велча $P<10^{-5}$ и $P>0,10$, соответственно).

У гибридов между *M. rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* наблюдалась выраженная асимметрия скрещивания. Мейоз большинства гибридов *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* проходил до стадии поздней пахитены, что было связано с высоким процентом синаптированных бивалентов на клетку (от 80% до 98%). Число MLH1 на клетку в пахитенных сперматоцитах у гибридов *M.*

mystacinus x *M. rossiaemeridionalis* не было снижено в сравнении с родительскими видами (тест Велча, $P > 0.05$). Мейоз гибридов *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* останавливался на стадии зиготены.

У гибридов *M. arvalis* x *M. kermanensis* в клетках присутствовали множественные униваленты, гетероморфные биваленты и триваленты, мейоз останавливался на стадии зиготены (Рис. 4В, Ж). Рекомбинация у гибридов *M. arvalis* x *M. kermanensis* была подавлена.

У самцов гибридов между видами с наибольшим временем дивергенции *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* мы наблюдали остановку мейоза на стадии лептотены и полное отсутствие синапсиса и рекомбинации (Рис. 4Г, З).

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*. Данные виды дивергировали около 0.8-1 млн лет назад (Neumann et al., 2006), их кариотипы различаются только по размеру и положению гетерохроматиновых блоков (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 исследовали самцов и самок гибридов между *P. sungorus* и *P. campbelli*. Известно, что гибридные самцы стерильны, а самки фертильны (Ishishita et al., 2015). Было показано, что у гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* наблюдается асимметрия скрещивания, так как гибриды самки *P. sungorus* и самца *P. campbelli* гибнут еще до рождения (Brekke et al., 2016).

3.1 Гистологический анализ гибридов рода *Phodopus*. Для определения спектра нарушений сперматогенеза у гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* Е.А. Кизиловой был проведен гистологический анализ динамики сперматогенеза у родительских видов (Рис. 5А) и гибридов (Рис. 5Б, В). У всех гибридов наблюдались множественные aberrации в морфологии семенных канальцев и их содержимого. В просвете канальцев не было нормально созревающих или зрелых сперматозоидов (Рис. 5Б, В). По стадии остановки сперматогенеза гибриды были разделены на группы А и Б. В семенных канальцах гибридов типа А содержались только редкие сперматогонии (Рис. 5Б). У гибридов типа Б в канальцах наблюдались редкие сперматиды и единичные сперматозоиды аномальной морфологии (Рис. 5В). 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, $P = 2 * 10^{-16}$). При этом в канальце накапливались сперматоциты на поздних стадиях профазы I.

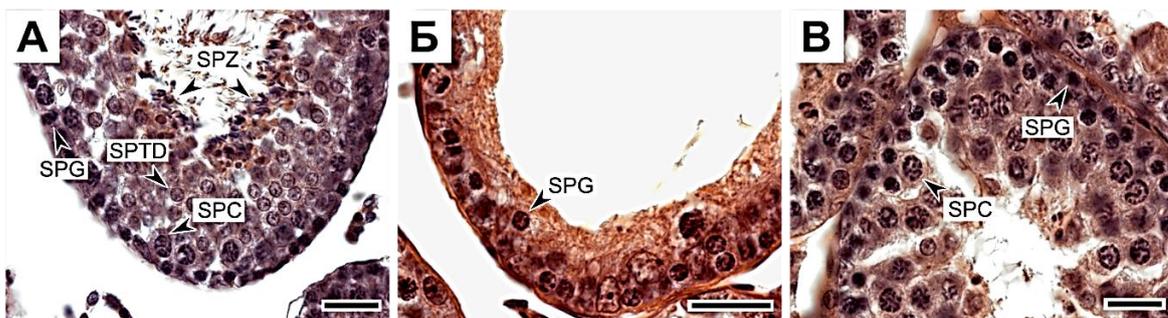


Рисунок 5. Гистологические срезы семенных канальцев *Phodopus campbelli* (А) и гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* типа А (Б) и типа Б (В), окрашенных гематоксилин-эозином. SPG, сперматогонии; SPC, сперматоциты; SPTD, сперматиды; SPZ, сперматозоиды. Масштаб: 20 мкм. Исходные фотографии были любезно предоставлены Е.А. Кизиловой.

3.2 Цитогенетический анализ гибридов рода *Phodopus*.

3.2.1 Синапсис и рекомбинация аутосом. В клетках на стадии средней-поздней пахитены негомологичные ассоциации и интерлокинг (зацепление негомологичных хромосом) были крайне редки и составляли не более 2.5% у родительских видов и 3.1% у гибридов. Мы не наблюдали значимых различий по числу сайтов MLH1 на клетку между гибридами и родительскими видами (t-критерий Стьюдента, $P > 0,05$). Это указывает на то, что рекомбинация аутосом не была нарушена у гибридов обоих полов.

3.2.2 Синапсис и рекомбинация полового бивалента XY. Большинство пахитенных клеток *P. sungorus* и *P. campbelli* содержали частично или полностью синаптированный XY бивалент (Рис. 6А). В норме в синапсис вовлекаются дистальный участок короткого плеча X (Xp) и длинного плеча Y (Yq). В некоторых клетках плечо Yr было полностью синаптировано с проксимальной частью Xq . Дистальная часть Xq оставалась асинаптированной и демонстрировала сильный сигнал $\gamma H2A.X$, в то время как в области синапсиса сигнал отсутствовал.

У гибридов большинство пахитенных сперматоцитов содержали синаптированные только дистальными концами или полностью асинаптированные половые хромосомы. На асинаптированных половых хромосомах сигнал $\gamma H2A.X$ был равномерно распределен по всей длине (Рис. 6Б). В клетках, где X- и Y-хромосомы были асинаптированы, они чаще всего располагались рядом друг с другом в общем облаке $\gamma H2A.X$ (Рис. 6Б).

Мы наблюдали достоверное различие между родительскими видами и гибридами по частоте асинапсиса XY (однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-4}$). Половой бивалент был синаптирован в $22 \pm 3\%$ сперматоцитов у гибридов по сравнению с $91 \pm 2\%$ у самцов *P. campbelli* и $89 \pm 2\%$ у самцов *P. sungorus*.

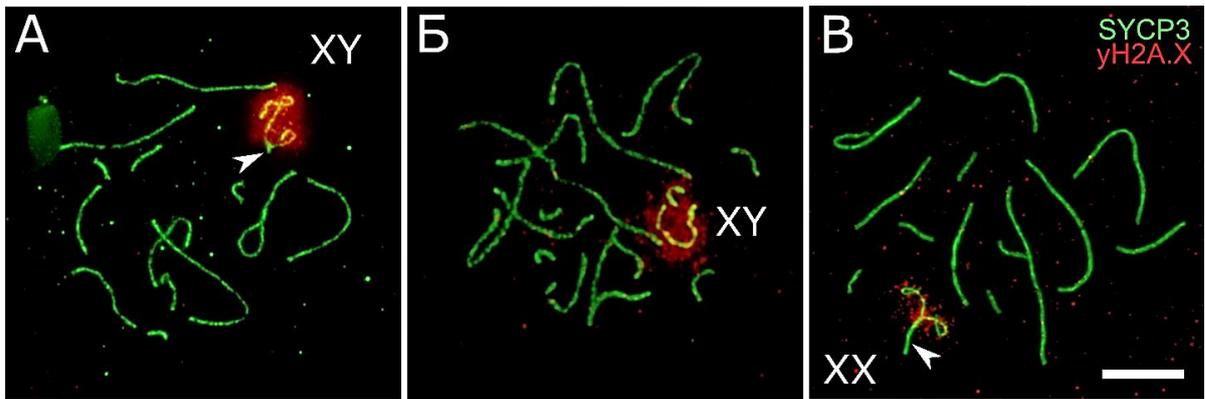


Рисунок 6. Пахитенные сперматоциты (А, Б) и ооцит (В) *P. sungorus* (А) и гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* (Б, В). Стрелки обозначают районы синапсиса половых бивалентов. Красный – γ H2A.X, зеленый – SYCP3. Масштаб – 10 мкм.

MLH1 всегда располагался в псевдоаутосомном районе (ПАР), расположенном в узком прителомерном районе Xp и Yq. У родительских видов около 65% бивалентов XY содержало поздний рекомбинационный узелок, тогда как у гибридов лишь 10% половых хромосом демонстрировало сигнал MLH1. Снижение частоты рекомбинации у гибридов 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 содержала половой бивалент XX с невыровненными центромерами и неспаренными теломерными концами короткого плеча (Рис. 6В). Так как подобные биваленты отсутствовали в сперматоцитах, мы предположили, что это половой бивалент. Предположение было подтверждено с помощью FISH с зондом X-хромосомы золотистого хомяка *Mesocricetus auratus*. Доля клеток с невыровненными центромерами у XX у гибридов составляла $70\pm 4\%$ по сравнению с $37\pm 3\%$ у самок *P. campbelli* и $52\pm 4\%$ у самок *P. sungorus*. Различие между гибридами и обоими родительскими видами было достоверным (однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-7}$). Некоторые биваленты XX с невыровненными центромерами демонстрировали частичный или полный асинапсис дистальных концов Xp в $62\pm 4\%$ у гибридов по сравнению с $10\pm 2\%$ у *P. campbelli* и $12\pm 2\%$ у *P. sungorus*. Различие между гибридами и родительскими видами было достоверным (однопропорциональный z-критерий, $P < 10^{-16}$). Неспаренные участки были помечены антителами γ H2A.X (Рис. 6В). Поскольку XX биваленты с неспаренными теломерными концами и невыровненными центромерами встречались в клетках с полностью синаптированными аутосомами (Рис. 6В), мы предполагаем, что большой гетерохроматиновый блок на коротком плече X-хромосомы (Vistorin et al., 1977; O'Brien et al., 2006), замедлял синапсис этого района. Мы не наблюдали сигналы MLH1 на гетерохроматиновом плече Xp.

ОБСУЖДЕНИЕ

1 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Alexandromys*. С помощью гистологического анализа гонад мы показали, что у представителей родительских видов, а также у гибридов между географически изолированными популяциями и хромосомными расами *A. evoronensis* сперматогенез протекает без нарушений. Простые гетерозиготы по нескольким хромосомным слияниям *A. evoronensis* «Арги» х *A. evoronensis* «Эворон» иногда демонстрировали задержку синапсиса в прицентромерных районах, что, по-видимому, было вызвано топологическими трудностями пресинаптического выравнивания гомологов. Следовательно, гетерозиготность по нескольким простым хромосомным слияниям и инверсиям/сдвигам центромер не оказывает негативного влияния на прохождение мейоза у полевок группы «*maximowiczii*», что согласуется с известными литературными данными по туко-туко (Lanzone et al., 2007; Basheva et al., 2014) и обыкновенной бурозубке (Wallace et al., 2002; Borodin et al., 2019).

Гибриды между тремя близкородственными видами *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* и *A. evoronensis* (Bannikova et al., 2010; Lissovsky et al., 2018) с сильной кариотипической дивергенцией были стерильны, что согласуется с ранее полученными данными (Meyer et al., 1996). Гибридная стерильность у самцов – это следствие аномалий развития сперматоцитов и сперматид, которые приводят к нарушению течения сперматогенеза. 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. Согласно результатам проведенного нами цитогенетического анализа, вероятной причиной мейотического ареста на стадии сперматоцитов у межвидовых гибридов группы «*maximowiczii*» является асинапсис гомеологичных хромосом. Сложная гетерозиготность по перичентрическим инверсиям и центромерным сдвигам у гибридов усложняла поиск гомологии, что усиливало задержку синапсиса (Рис. 2В, Г, Ж, З) и приводило к транскрипционному сайленсингу асинапсированных районов. Клетка, в которой подавляется экспрессия генов, необходимых для мейотической прогрессии сперматоцитов, не проходит точку контроля пахитены, что может приводить к остановке мейоза (Burgoyne et al., 2009; Turner, 2015) и, как следствие, апоптотической гибели клетки (Odorisio et al., 1998; Cloutier and Turner, 2010).

Анализ молекулярных часов предполагает, что группа видов, в которую входят *A. maximowiczii*, *A. tujanensis* 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 значимой причиной гибридной стерильности самцов. 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 усилению существующей кариотипической межвидовой дивергенции, а следовательно – гибридной стерильности. Таким образом, можно предположить, что накопление сложных хромосомных перестроек в небольших изолированных популяциях было важным механизмом видообразования в группе «*maximowiczii*».

2 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Microtus*. Мы оценивали стерильность самцов гибридов родительских видов с разной степенью генетической дивергенции по спектру аномалий сперматогенеза. В целом число нарушений сперматогенеза у гибридов возрастало с увеличением генетической дистанции между родительскими видами. Выраженность мейотических aberrаций у гибридов соответствовала степени нарушения сперматогенеза. Так, у гибридов между близкородственными видами *M. kermanensis* и *M. rossiaemerdionalis* только несколько пар хромосом наименьшего размера были асинаптированы к концу пахитены в некоторых клетках (Рис. 4Б, Е). Напротив, во всех клетках у гибридов между наиболее отдаленными видами *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* ни одна пара хромосом не была синаптирована.

Феномен, когда более короткие аутосомы более чувствительны к нарушению синапсиса, был ранее описан у мышей (Gregorova et al., 2018). Несмотря на то, что несколько коротких хромосом подвергались мейотической транскрипционной инактивации, остановки мейоза не происходило. Однако даже такие незначительные нарушения синапсиса привели к образованию аномальных сперматозоидов и к полной стерильности. Вероятно, это связано с сохранением подавления транскрипции в сперматидях, 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 множественных 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.

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 вовлеченности конкретного молекулярного механизма.

3 Механизм формирования гибридной стерильности у представителей рода *Phodopus*. Мы подтвердили ранее описанную гетерогенность стерильных гибридов *P. campbelli* x *P. sungorus* по стадии остановки сперматогенеза. Эта изменчивость в фенотипе стерильности может быть связана 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).

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. 6). Следовательно, причиной стерильности, вероятно, является асинапсис ХУ-бивалента, как ранее предположил Ишишита с коллегами (2015). У гибридов частота асинапсиса Х- и Y-хромосом была в восемь раз выше в сравнении с родительскими видами.

Известно, что синапсис и рекомбинация в псевдоаутосомном районе 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 остановки мейоза вследствие асинапсиса ХУ может быть нарушение мейотического сайленсинга половых хромосом, маркером которой является γ H2A.X. При этом гены, расположенные в синаптированном ПАР, избегают мейотической инактивации (Raudsepp and Chowdhary, 2016). Инактивация генов, необходимых для прохождения сперматогенеза, может быть причиной нарушения сперматогенеза в сперматоцитах с асинапсисом половых хромосом.

Высокий процент асинапсиса ПАР у самцов гибридов хомячков может быть связан с потерей гомологии нуклеотидных последовательностей. Основной причиной быстрой эволюции ПАР является его высокий уровень рекомбинации в мейозе у самцов (Soriano et al., 1987). Иными словами, там практически всегда происходит один облигатный обмен.

Высокий уровень рекомбинации неизбежно приводит к геномной нестабильности ПАР и возникновению различных мутаций (Ross et al., 2005; Bussell et al., 2006), которые могут репарироваться во время мейоза у самок или сегрегировать в разные гаметы в ходе оогенеза, а затем элиминироваться путем естественного отбора. Однако у мохноногих хомячков ПАР расположен на плече с большим гетерохроматиновым блоком (Vistorin et al., 1977; Schmid et al., 1986; Romanenko et al., 2007), который может подавлять рекомбинацию (Stack, 1984; Ashley, 1988; Dumont, 2016). Блок рекомбинации на всем протяжении Хр, 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 ХХ, по-видимому, накапливают 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 асинапсиса половых хромосом у межвидовых гибридов, что, в свою очередь, вероятно, является основной причиной гибридной стерильности у самцов мохноногих хомячков.

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 основных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Bikchurina, T. I.**, Tishakova, K. V., Kizilova, E. A., Romanenko, S. A., Serdyukova, N. A., Torgasheva, A. A., & Borodin, P. M. (2018). Chromosome synapsis and recombination in male-sterile and female-fertile interspecies hybrids of the dwarf hamsters (*Phodopus*, Cricetidae). *Genes*, 9(5), 227, WoS, Scopus, IF= 4.141;

2. **Bikchurina, T. I.**, Golenishchev, F. N., Kizilova, E. A., Mahmoudi, A., & Borodin, P. M. (2021). Reproductive isolation between taxonomically controversial forms of the gray voles (*Microtus*, Rodentia; Arvicolinae): cytological mechanisms and taxonomical implications. *Frontiers in genetics*, 12, 575, WoS, Scopus, IF= 4.365;

3. **Bikchurina, T.**, Pavlenko, M., Kizilova, E., Rubtsova, D., Sheremetyeva, I., Kartavtseva, I., Torgasheva, A. & Borodin, P. (2023). Chromosome asynapsis is the main cause of male sterility in the interspecies hybrids of East Asian voles (*Alexandromys*, Rodentia, Arvicolinae). *Genes*, 14(5), 1022, WoS, Scopus, IF= 4.141.