

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗИНА

Біологічний факультет

Кафедра зоології та екології тварин

Кваліфікаційна робота
здобувачки другого (магістерського) рівня вищої освіти
за темою:

**ДОСЛІДЖЕННЯ ГІБРИДНОЇ СТЕРИЛЬНОСТІ Й КЛОНАЛЬНОСТІ
В ГІБРИДОГЕННОМУ КОМПЛЕКСІ РИБ РОДУ *FUNDULUS***

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія
Освітня програма Біологія

Виконавець: _____



Ксенія Обіденна

Науковий керівник: _____ Дмитро Шабанов



Науковий консультант: _____ Дмитро Дідух

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Обідена К. А. Дослідження гібридної стерильності й клональності в гібридогенному комплексі риб роду *Fundulus*. – Магістерська робота. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра зоології та екології тварин, Харків, 2025.

Магістерська робота викладена на 91 сторінках, що включає в себе наступні розділи: перелік умовних скорочень, зміст, вступ, основна частина, результати дослідження, обговорення, висновки та список використаної літератури. Дана робота включає 1 таблицю, 7 рисунків, 198 використаних джерел.

Робота виконувалася у рамках стажування в Інституті фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чехія) під керівництвом доктора Дмитра Дідуха. Особистий вклад авторки роботи – брала участь у імунофлуоресцентному фарбуванні хромосом на стадії пахітени, отримувала препарати мітотичних хромосом, виділяла ДНК, готувала зонди методом ПЛР та оцінювала їх якість за допомогою електрофорезу. Проводила флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) та порівняльну геномну гібридизацію (CGH) на препаратах мітотичних хромосом, а також імунофлуоресцентне фарбування на фрагментах гонад. Проводила флуоресцентну та конфокальну мікроскопію, а також обробку отриманих даних.

Різноманіття способів розмноження у тварин включає як статеві, так і нестатеві (асексуальні) стратегії. Статеве розмноження є найбільш поширеним і забезпечує генетичну мінливість та еволюційну адаптивність, тоді як нестатеве розмноження існує завдяки здатності формувати клональні лінії, в яких відтворення можливе без включення генетичного матеріалу обох статей. У свою чергу, клональність зазвичай є наслідком гібридизації. Цей процес може як сприяти появі нових форм, так і

створювати репродуктивні бар'єри між видами, часто порушуючи гаметогенез, тим самим знижуючи фертильність або викликаючи стерильність.

Ця робота присвячена дослідженню механізмів гаметогенезу у асексуальних гібридів роду *Fundulus*, які досі залишалися малодослідженими. У ході роботи за допомогою комбінованих цитогенетичних методів (порівняльна геномна гібридизація (CGH) флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), імунофлуоресцентне фарбування та конфокальна мікроскопія) вивчалися особливості розмноження представників природних клональних ліній, виловлених в озері Портера (Porters Lake, Нова Шотландія, Канада), а також гібридів від штучних схрещувань, що проводилися в Університеті Святої Марії (Галіфакс, Нова Шотландія). Застосування сучасних методів флуоресцентної мікроскопії та специфічних ДНК-зондів дозволило картувати тандемні повтори на хромосомах кожного з батьківських видів і підтвердити їх видоспецифічність. Картування цих повторів на хромосомах гібридів дозволило не тільки вирізнити гібридів, але й виявити поліморфізм у клональних природних гібридів в порівнянні з F1 гібридами. Подальший аналіз мейотичних хромосом дав змогу встановити механізми гаметогенезу в гібридів та пояснити збереження клональної репродукції у досліджуваних природних гібридів. Отже, ми вперше комплексно поєднали цитогенетичні і молекулярні підходи для виявлення механізмів клонального відтворення у *Fundulus*. Уперше для F1-гібридів цього комплексу показано здатність до утворення клональних гамет завдяки ендореplikації, що забезпечує їхню фертильність. У ході дослідження було підтверджено дані про стерильність самців, що пов'язано з порушеннями мейозу, і виявлено, що самиці гібридів здатні формувати фертильні диплоїдні ооцити завдяки премейотичній ендореplikації. Відсутність F1-гібридів у природних популяціях разом із наявністю форм, що

відрізняються за розподілом тандемних повторів, свідчить про еволюційне закріплення окремих клональних ліній.

Ключові слова: гібриди, *Fundulus*, гаметогенез, гіногенез, клональність, стерильність, нестатеве розмноження, мейоз, ендореплікація

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ATL buffer – Animal tissue lysis buffer, лізувальний буфер для руйнування клітинних мембран
- BSA – Bovine serum albumin, білок великої рогатої худоби, використовується для блокування неспецифічного зв'язування антитіл.
- CGH – comparative genomic hybridization, порівняльна геномна гібридизація
- DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol
- DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
- FISH – Fluorescent *in situ* hybridization, флуоресцентна гібридизація *in situ*
- MLH1 – MutL homolog 1, білок репарації ДНК, маркер кросинговеру.
- PBS – Phosphate buffered saline, фосфатно-сольовий буфер
- PFA – paraformaldehyde, параформальдегід
- Rad51 – DNA repair protein RAD51, рекомбінаційний білок, що бере участь у гомологічній рекомбінації
- SSC – Saline sodium citrate, цитратно-сольовий буфер
- SYCP1 – Synaptonemal complex protein 1, білок центрального елемента синаптонемного комплексу
- SYCP3 – Synaptonemal complex protein 3, білок латеральних елементів синаптонемного комплексу
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНА ЧАСТИНА	10
1.1 Статеве і нестатеве розмноження	10
1.2 Гібридизація, її роль у видоутворенні. Стерильність і клональність гібридів	13
1.3 Клональні способи розмноження: партеногенез, андрогенез, гіногенез, клептогенез та гібридогенез	15
1.3.1 Партеногенез	15
1.3.2 Андрогенез	17
1.3.3 Клептогенез	18
1.3.4 Гібридогенез	19
1.3.5 Гіногенез: типи, механізми, приклади	21
1.4 Гібридогенний комплекс риб роду <i>Fundulus</i>	29
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
2.1 Особистий внесок	31
2.2 Збір матеріалу	31
2.3 Отримання мітотичних та мейотичних хромосом	32

2.4 Отримання пахітенових хромосом та імунофлуоресцентне забарвлення	32
2.5 Виділення ДНК	34
2.6 Приготування зондів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і електрофорез	35
2.7 Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i> (FISH)	36
2.8 Порівняльна гібридизація геномів (CGH)	37
2.9 Імунофлуоресцентне забарвлення цілих гонад	38
2.10 Світлова, флуоресцентна та конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія та обробка фотографій	39
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
3.1 Каріотипування та FISH-картування	40
3.2 Гібридні самці демонструють порушення гаметогенезу, тоді як гібридні самки мають морфологію гонад, подібну до батьківських видів	44
3.3 Мейотичні особливості та премейотична ендореплікація у <i>F. diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> та їх природних гібридів	46
3.4 Аналіз гаметогенезу у гібридів F1	50
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ	53
4.1 Структурна цілісність хромосом і локалізація видоспецифічних повторів у клональних гібридів	53
4.2 Стерильність самців та фертильність самиць у природних гібридів	55
4.3 Гаметогенез у лабораторних гібридів F1	59

ВИСНОВКИ	62
ПОДЯКИ	64
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	65
ANNOTATION	89

ВСТУП

Гібридизація є одним із важливих механізмів еволюції, який може як сприяти виникненню нових форм, так і створювати бар'єри між уже існуючими видами [1, 2, 3, 4]. Вона часто супроводжується порушеннями нормального перебігу гаметогенезу, що проявляється у зниженій фертильності або повній стерильності гібридів [5, 6]. У деяких випадках наслідком таких порушень стає перехід до нестатевих форм відтворення (партеногенезу, андрогенезу, гіногенезу, клептогенезу, гібридогенезу), які забезпечують існування клональних ліній [7, 8, 9].

Серед різних груп хребетних саме риби роду *Fundulus* становлять особливий інтерес як природна модель для вивчення механізмів гібридного розмноження [10, 11, 12]. Види *Fundulus diaphanus* і *F. heteroclitus*, попри значну еволюційну віддаленість, утворюють у природі життєздатних і гібридів, що мешкають у прибережних солонуватих водоймах Атлантичної Канади [13, 14, 15, 16]. Частина таких гібридів формує стабільні асексуальні (клональні) популяції, представлені плідними самицями та стерильними самцями [17].

Проблема умов та механізмів формування гамет у цих гібридів залишається відкритою. Зокрема, маловідомо, які саме цитогенетичні процеси сприяють збереженню клональної репродукції у самиць і водночас зумовлюють стерильність самців. Розуміння цих явищ має важливе значення не лише для з'ясування закономірностей гіногенезу, але й для ширших еволюційних досліджень, що стосуються походження безстатевості у хребетних.

Актуальність роботи полягає у необхідності комплексного дослідження гаметогенезу у природних і лабораторних гіногенетичних гібридів *Fundulus* із використанням сучасних цитогенетичних та молекулярних методів. Такий підхід дозволяє виявити особливості

мейотичних процесів, оцінити гаметогенез і пояснити причини відмінностей у репродуктивній здатності гібридів різної статі.

Мета роботи – дослідити механізми гаметогенезу у природних та лабораторних гібридів роду *Fundulus* і з'ясувати цитогенетичні основи клональної репродукції та гібридної стерильності.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

Провести аналіз наявних даних щодо видової структури та особливостей відтворення в гібридогенному комплексі *Fundulus*.

Виконати картування тандемних повторів, виявлених за допомогою біоінформатичних методів, на метафазних хромосомах обох батьківських видів (*F. diaphanus* та *F. heteroclitus*), а також їх F1 гібридів і клональних ліній з використанням флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH).

Дослідити особливості цитогенетичних процесів гаметогенезу, зокрема кон'югації хромосом та розподіл клітин за плоїдністю, у батьківських видів та їх F1 і клональних гібридів за допомогою імунофлуоресцентного фарбування хромосом на стадії пахітени мейозу.

Проаналізувати морфологію та мікроанатомію гонад батьківських видів і гібридів обох статей шляхом імунофлуоресцентного фарбування і аналізу за допомогою конфокальної мікроскопії для оцінки їх потенційної фертильності.

Проаналізувати цитогенетичні особливості відтворення і припустити їх зв'язок з процесами гібридизації у комплексі *Fundulus*.

РОЗДІЛ 1. ОСНОВНА ЧАСТИНА

1.1 Статеве і нестатеве розмноження

Статеве розмноження є найпоширенішим способом відтворення серед еукаріот, а мейоз є його центральним механізмом, який забезпечує не лише редукцію хромосомного набору та стабільність геному в поколіннях, а й створює основу для еволюційної мінливості. У процесі мейозу відбувається кон'югація гомологічних хромосом, що є передумовою для подальшого кросинговеру, тобто обміну ділянками ДНК між материнськими та батьківськими хромосомами, іншими словами гомологічна рекомбінація [18, 19]. Рекомбінація є еволюційно консервативним механізмом, що забезпечує підтримання цілісності геному. Цей процес не лише створює генетичну різноманітність статевих клітин, а й забезпечує фізичне з'єднання гомологів хромосом, необхідне для їх правильної сегрегації [18, 20]. Цей механізм є надзвичайно давнім і спостерігається у представників вищих організмів, тобто рослин, грибів і тварин [18, 21, 22, 23, 24]. Як підкреслюють Lenormand та співавтори (2016) [25], рекомбінація має подвійний еволюційний ефект: з одного боку, вона сприяє усуненню шкідливих мутацій та прискорює адаптивну еволюцію, дозволяючи поєднувати корисні алельні варіанти з різних ліній. З іншого боку, надмірна або невпорядкована рекомбінація може руйнувати коадаптовані гени, знижуючи пристосованість організму. Таким чином, оптимальна частота кросинговеру формується як результат балансу між необхідністю генетичного оновлення та збереженням функціональних генетичних комплексів [25].

У класичному мейозі диплоїдна клітина проходить два послідовні процеси, а саме редукційний і еквацийний поділи. При цьому кількісний набір хромосом зменшується до гаплоїдного та утворюються гамети, які надалі заплідняються. Під час редукційного поділу гомологічні хромосоми розходяться до протилежних полюсів, що забезпечує зменшення

хромосомного набору у дочірніх клітинах, а у наступному еквацийному поділі сестринські хроматиди розходяться, формуючи чотири гаплоїдні клітини [26, 27]. У гаметогенезі ці гаплоїдні клітини диференціюються залежно від статі: в самців усі чотири клітини перетворюються на сперматозоїди, тоді як у самок лише одна стає функціональною яйцеклітиною, а інші три стають полярними тільцями [27].

Попри поширеність, статеве розмноження має низку недоліків. Основними з них є так звані «подвійні витрати на стать» [28]: по-перше, самці не продукують потомства напямую, що знижує репродуктивну ефективність популяції, по-друге, необхідність пошуку двох сумісних, але генетично різних особин ускладнює і сповільнює процес розмноження [29, 30]. Як зазначав August Weismann, статеве розмноження є своєрідним тягарем, оскільки вимагає спеціалізованих морфологічних структур і зменшує швидкість відтворення, проте воно забезпечує генетичну мінливість, необхідну для дії природного відбору [31]. Пізніші дослідження розкрили переваги цієї мінливості, зокрема у роботах Fisher та Muller було показано її еволюційне значення [32, 33]. Концепція регуляції систем рекомбінації говорить, що багато структурних і екологічних особливостей організмів, включно зі статевістю та безстатевістю, узгоджуються для оптимального утворення генетичних рекомбінантів [34, 35].

На відміну від статевого, нестатеве (асексуальне) розмноження не передбачає злиття гамет двох різних статей, тобто не вимагає участі як самця, так і самки одночасно [36]. До асексуального розмноження належать дві основні форми. Класичні механізми, такі як бінарний поділ, брунькування або фрагментація, дозволяють новому організму розвиватися без участі статевих клітин: при бінарному поділі клітина просто ділиться навпіл, при брунькуванні новий індивід виростає як брунька на тілі батьківської особини, а при фрагментації частини тіла або організму можуть давати початок новій особині [37]. Ці процеси характерні для

бактерій, одноклітинних еукаріот, дріжджів, гідр, рослин та деяких безхребетних. В іншому випадку, організм розвивається з гамет (переважно яйцеклітин), проте без запліднення, як це відбувається під час партеногенезу, гіногенезу тощо. Обидва типи забезпечують точне копіювання генетичного матеріалу батьків, що робить потомство генетично ідентичним, тобто клонами. У цьому випадку достатньо утворення лише одного типу гамет для ініціації розвитку нового організму, а саме яйцеклітин, рідше – сперматозоїдів [8, 19]. Така форма розмноження є типовим прикладом клональності, оскільки потомство формується шляхом точного копіювання генетичного матеріалу одного з батьків. Ключова перевага нестатевого розмноження – можливість розмноження без участі партнера, що значно підвищує репродуктивну ефективність популяції, оскільки не доводиться витрачати час і сили на пошук партнера [38, 39, 40]. Оскільки всі нащадки є клонами, їм легше адаптуватися до тих самих умов середовища, що й батьки, а тому вони швидше поширюються на нові території [41].

Водночас, асексуальне розмноження має свої недоліки. Попри короткострокові переваги, клональне розмноження може мати серйозні обмеження для нестатевих популяцій у довготривалій перспективі. Через генетичну ідентичність усіх особин, такі популяції є надзвичайно вразливими до тих же патогенів, що і їх батьки. Захворювання однієї особини може швидко знищити всю популяцію. Це явище пояснюється ефектом Червоної Королеви – концепцією в еволюційній біології, яка стверджує, що види повинні постійно адаптуватися та еволюціонувати, щоб вижити, змагаючись з постійно еволюціонуючими суперниками, такими як, наприклад, патогени [42, 43]. У цьому контексті статеве розмноження забезпечує генетичну різноманітність, що дозволяє організмам "втікати" від патогенів. Окрім того, обмежена генетична варіативність суттєво знижує здатність популяцій адаптуватися до змін навколишнього середовища, що підвищує ризик їх зникнення в умовах

екологічної нестабільності [43, 44, 45]. Проте, попри ці проблеми, деякі асексуальні лінії здатні зберігати або навіть збільшувати генетичну різноманітність у природних популяціях протягом тисяч поколінь і можуть відігравати роль проміжного етапу у процесі видоутворення.

1.2 Гібридизація, її роль у видоутворенні. Стерильність і клональність гібридів

Клональне розмноження зазвичай пов'язане з гібридизацією у більшості тварин та рослин і, у хребетних, майже завжди виникає внаслідок гібридизації, за винятком рідкісних випадків спонтанного клонального розмноження у деяких видів риб, плазунів та птахів [46, 47]. Гібриди виникають як наслідок міжвидового схрещування і містять у собі поєднання генетичних матеріалів батьків обох видів. Міжвидова гібридизація колись вважалася рідкісним еволюційним явищем, але зараз поширена в природі та визнається рушійною силою різних еволюційних наслідків [5].

Гібридизація найчастіше відбувається в географічних областях, де перетинаються ареали близькоспоріднених видів і відбувається регулярне схрещування між ними. Такі області називаються гібридними зонами [48, 49]. Детальні дослідження амфібій показують, що гібридні зони є динамічними структурами: у різних частинах однієї зони виявлено відмінні патерни потоку генів і ступеня ізоляції, що свідчить про еволюцію самої гібридної зони та можливу різну силу бар'єрних механізмів на протилежних її краях [50]. Так два види смугастих тритонів *Ommatotriton nesterovi* і *O. ophryticus* формують вузьку гібридну зону шириною до 60 км у північній Туреччині, де відбувається обмежений, але стабільний обмін генами [50]. Водночас між видами *Bufo bufo* і *B. spinosus* існує широка, близько 800 км завдовжки гібридна зона, що тягнеться через Францію [50]. У тих гібридних зонах, де нащадки частково стерильні або мають гіршу пристосованість, природний відбір може діяти проти гібридизації і сприяти розвитку додаткових репродуктивних бар'єрів. Цей процес відомий як

підкріплення (reinforcement) і дозволяє посилювати ізоляцію між популяціями, запобігаючи зворотному змішуванню генів [1, 2]. Таким чином, гібридизація в певних умовах може діяти не як фактор об'єднання, а навпаки, як механізм розділення видів. Зазвичай гібридизація призводить до формування стерильного потомства, як це спостерігається у лігрів (гібрид лева і тигриці) чи мулів (гібрид віслюка і коня) або суттєво знижує фертильність гібриду. Це пояснюється відмінностями в геномах батьківських видів, що унеможливорює формування пар хромосом і перешкоджає нормальній рекомбінації під час мейозу [6, 51, 52]. Тим не менш, якщо хромосоми батьківських видів здатні хоча б частково кон'югувати, гени одного з видів можуть поступово інтегруватися з генами іншого – цей процес називається інтрогресією. Інтрогресія не обов'язково веде до появи нового виду, але дозволяє передавати адаптивні ознаки між видами, покращуючи виживання окремих ліній [53, 54]. Коли інтрогресія набирає масового характеру утворюються гібридні рої [55]. Це популяції, в яких міжвидові схрещування відбуваються багаторазово протягом кількох поколінь, що призводить до широкого генетичного обміну, формування нових комбінацій алелей та навіть витіснення батьківських видів, як це спостерігається у риб *Cyprinella* та раків *Orconectes* [56, 57, 58]. У рідкісних випадках інтрогресія може завершитися повним злиттям геномів, унаслідок чого виникає новий стабільний вид. Це явище, відоме як гомоплоїдне гібридне видоутворення, задокументоване, зокрема, у деяких ссавців і птахів [3, 4]. Відбувається таке зазвичай між видами з незначною хромосомною та генетичною дивергенцією, що дозволяє зберігати нормальну мейотичну сумісність і формування життєздатного потомства.

Видоутворення внаслідок міжвидової гібридизації трапляється у тварин рідше, порівняно з рослинами [9]. Майже третина сучасних видів судинних рослин зазнали або мають предків, які зазнали спонтанної дуплікації всього геному [59]. У той час як більшість рослин долають проблему мейозу між різними наборами хромосом шляхом

тетраплоїдизації, гібриди тварин часто уникають гібридної стерильності шляхом клонального розмноження [9, 60]. Клональне розмноження особливо тісно пов'язане з поліплоїдизацією. У природних популяціях більшості клональних тварин, як безхребетних, так і хребетних, зустрічаються життєздатні диплоїди, триплоїди та тетраплоїди [7, 61]. Виникнення триплоїдів серед хребетних хоч і не рідкісне явище, проте вважалося, що вони можуть розмножуватися лише співіснуючи в репродуктивній спільноті з одним з батьківських видів або з гібридами різної плоїдності [62, 49]. В таких поліплоїдних системах триплоїди іноді здатні продукувати гаплоїдні або диплоїдні гамети, сприяючи переходу гібридів до нового рівня плоїдності або навіть частковому поверненню до статевого розмноження, як, наприклад, це відбувається у популяціях диплоїдних та триплоїдних зелених жаб *Pelophylax esculentus* [9] або риб *Cobitis hankugensis-Iksookimia longicorpa* [63]. Інакше це ще називають “триплоїдним мостом”, оскільки триплоїдні особини можуть виступати проміжною ланкою між диплоїдними та тетраплоїдними формами [48, 49]. Проте наразі вже виявили триплоїдних тварин, а саме ропух *Bufo baturae*, які здатні розмножуватися статевим в межах триплоїдної популяції [62, 64]. У тетраплоїдних організмів відбувається часткове або повне відновлення мейозу завдяки можливості формувати біваленти між гомологічними наборами хромосом, що стабілізує мейотичний поділ і дозволяє повернення до статевого розмноження [3, 5].

1.3 Клональні способи розмноження: партеногенез, андрогенез, гінгеногенез, клептогенез та гібридогенез

1.3.1 Партеногенез

Партеногенез – тип нестатевий розмноження, коли ріст і розвиток ембріонів відбувається без участі сперматозоїдів, тобто нащадки є клонами самиці. Виділяють дві основні форми партеногенезу: факультативний та облігатний [65].

Факультативний партеногенез є формою партеногенезу, за якої організми, що зазвичай розмножуються статевим шляхом, здатні продукувати потомство без запліднення у разі відсутності самців [66, 65]. Основою цього процесу є розвиток зародка з незаплідненої яйцеклітини, проте для формування життєздатного диплоїдного організму необхідне відновлення подвійного набору хромосом. Найчастіше це відбувається шляхом термінального злиття, коли після мейозу зливаються два гаплоїдні ядра (ядро ооцита з ядром полярного тільца, що походять від однієї яйцеклітини) [67]. Також відомі випадки, коли факультативний партеногенез забезпечувався постмейотичною ендореплікацією, тобто подвоєнням геному після завершення мейозу, коли гаплоїдна яйцеклітина проходить ще один цикл реплікації ДНК без поділу ядра. У результаті утворюється гомозиготна диплоїдна клітина, здатна розпочати розвиток без запліднення, як це спостерігається, наприклад, у деяких представників асексуальних ящірок роду *Aspidoscelis* [68]. Факультативний партеногенез досліджений у кількох лініях ящірок, змій, птахів, а також серед хрящових риб [67, 69, 70].

На відміну від цього, облігатний партеногенез є стратегією, за якої розмноження відбувається виключно безстатєво. У рептилій він виник незалежно в кількох лініях, включно зі зміями, ігуанами, сцинками, агамідами, лацертидами, геконами тощо, серед яких відомі також поліплоїдні лінії, що виникли внаслідок давніх гібридизаційних подій [40, 71]. Механізм формування нередукованих яйцеклітин у видів з облігатним партеногенезом досліджений лише для кількох родів ящірок. У представників роду *Aspidoscelis*, роду *Darevskia* та деяких геконів *Hemiphyllodactylus*, *Heteronotia* і *Lepidodactylus* збереження рівня плоїдності забезпечується премейотичною ендореплікацією [72, 73, 74]. Унаслідок цього під час першого мейотичного поділу пари формуються не між гомологічними, а між сестринськими хромосомами, що дає змогу підтримувати гетерозиготність гібридного геному. При цьому більшість

ооцитів не проходить премейотичну дуплікацію, не утворює стабільних бівалентів і зупиняється на стадії пахітени мейозу, після чого зазвичай деградує [72, 73, 74, 75]. Лише невелика частина клітин, тобто ендорепліковані, успішно завершує мейоз і формує нередуковані яйцеклітини, здатні до партеногенетичного розвитку [72, 73, 74]. Це дозволяє породжувати життєздатне плідне потомство, яке є генетично майже ідентичним до материнської особини [73, 76].

1.3.2 Андрогенез

Андрогенез – тип клонального розмноження, при якому весь ядерний геном потомства походить від самця, а геном самиці елімінується. При чому потомство містить генетичний матеріал лише самця [77, 78, 79]. У класичному випадку андрогенезу сперматозоїд або пилкок зливається з яйцеклітиною, в якій видаляється материнський геном. Існують також альтернативні варіанти, коли яйцеклітина вже позбавлена ядра, і після запліднення потомство отримує лише батьківський геном [79, 80]. Для нормального розвитку ембріонів необхідна диплоїдизація батьківського геному, а механізми диплоїдизації та статевої диференціації забезпечують стабільність андрогенетичних ліній [80]. Хоча андрогенез у природі трапляється рідко, він все ж зустрічається у деяких популяціях, зокрема у хвойних дерев, молюсків роду *Corbicula*, кількох видів мурах та паличників роду *Bacillus* [79, 81, 82, 83, 84]. У *Cupressus dupreziana*, рідкісного гермафродитного хвойного дерева, андрогенез є єдиною формою розмноження. Андрогенез у *C. dupreziana* не включає елімінацію материнського геному: насіннєві зачатки позбавлені ядра й формують лише тканини ендосперму та інших компонентів насіння, тоді як сам зародок, включно з мітохондріями та хлоропластами, повністю походить від диплоїдного пилку [82, 83]. Цей механізм дозволяє утворювати андрогенетичне потомство навіть через запилення спорідненими видами, наприклад *C. sempervirens*, проте механізм диплоїдизації батьківського геному залишається невідомим [80]. Андрогенез у представників роду

Corbicula розглядається як еволюційний перехід від статевого до клонального розмноження, спричинений модифікацією мейозу в обох статях. У самців перший мейотичний поділ є абортивним, через що гомологічні хромосоми не розходяться, і формуються нередуковані, переважно диплоїдні або триплоїдні сперматозоїди, що зберігають гетерозиготність [81]. Після запліднення в оогенезі всі материнські хромосоми елімінуються у вигляді двох полярних тілець, тому зигота успадковує лише батьківський геном [85]. У деяких представників паличників роду *Bacillus* при андрогенезі яйцеклітина теж запліднюється, але диплоїдне потомство, що розвивається, несе два батьківські геноми та жодного материнського геному. Це пов'язують з поліспермією – проникненням двох гаплоїдних сперматозоїдів, які спільно ініціюють розвиток ембріона без участі материнського ядра [86]. Більш детальні механізми для них досі вивчаються [84].

Наразі андрогенез індукують штучно задля отримання гомозиготного потомства та прискореного розведення бажаних генотипів. Також він вважається цінним інструментом для відновлення зникаючих або вимерлих видів [87]. У риб з зовнішнім заплідненням гамети опромінюють або фрагментують в них ДНК в гаметах, після чого зливають з гаметою іншого батька, а диплоїдія відновлюється тепловим або тисковим шоком, що дозволяє отримати клони з комерційно цінними ознаками. У лососевих близько 30% оброблених яєць дають життєздатних нащадків [88, 78]. У рослин штучний андрогенез застосовується для прискореного створення інбредних ліній, які потім використовують для гібридизації: його індукують *in vivo* через опромінення або температурний шок (*Crepis tectorum*, *Antirrhinum majus*) або *in vitro* культивуванням мікроспор, де спонтанна диплоїдизація формує диплоїдні рослини [80, 89].

1.3.3 Клептогенез

Клептогенез – унікальна форма нестатевого розмноження, притаманна деяким гібридним самицям амбістом (*Ambystoma*) різної

плоїдності, які для активації розвитку яйцеклітин спаровуються з самцями близькоспоріднених видів. На відміну від класичного гіногенезу, за якого інтеграція генетичного матеріалу сперматозоїда не відбувається, запліднення тут не обмежується лише стимуляцією ембріогенезу: сперматозоїд може частково або повністю інтегрувати свій генетичний матеріал у зиготу. Клептогенетичні самиці продукують яйцеклітини з геномом, ідентичним материнському, який формується внаслідок процесу ендореplikації, але, на відміну від партеногенетичних форм, для активації та подальшого розвитку яйцеклітини необхідне запліднення сперматозоїдом від близькоспорідненого виду [90]. Відомо три основні результати такого "запліднення": (1) повна елімінація чоловічого пронуклеуса, що призводить до гіногенетичного розвитку; (2) повне прийняття чоловічого геному, внаслідок чого зростає рівень плоїдності (формуються три-, тетра- чи пентаплоїдні форми); (3) часткове заміщення материнського геному геномом батьківського виду, що утворює мозаїчне потомство [90, 91, 92]. Таким чином, геном самиці може або повністю повторювати соматичний набір, або включати окремі фрагменти генетичного матеріалу відповідного виду. Цей механізм дозволяє гібридним амбістомам одночасно зберігати клональність і запобігати накопиченню шкідливих мутацій через періодичне «оновлення» частини геному від статевих популяцій. Клептогенетичний комплекс *Ambystoma* є найтривалішою відомою клональною лінією серед хребетних, що існує приблизно 2,4–3,9 млн років, попри відсутність звичайних механізмів рекомбінації та потенційні еволюційні обмеження для нестатевого розмноження [91, 92].

1.3.4 Гібридогенез

Гібридогенез — це тип напівклонального (геміклонального) розмноження міжвидових диплоїдних і поліплоїдних гібридів, при якому під час гаметогенезу відбувається елімінація одного з батьківських геномів та ендореplikація решти геному, при цьому геном соматичних клітин

залишається незмінним [93]. Геміклональність забезпечує одночасну передачу гібридам геному від одного з батьків клонально, тобто без рекомбінації, а від іншого – статеву, тобто з рекомбінацією. Гібридогенез зустрічається у деяких риб роду *Poeciliopsis*, *Hypseleotris*, *Hexagrammos* та європейських зелених жаб роду *Pelophylax* [94, 95, 96, 97, 98, 99]. Хоча гібридогенез може відбуватися в різних таксонах тварин, включаючи безхребетних, риб та жаб [100], він був особливо добре вивчений у деяких видів жаб роду *Pelophylax*. Класичний гібридогенез у цих жаб ґрунтується на елімінації одного батьківського геному та ендореплікації другого батьківського геному перед початком мейозу [101, 102]. Для успішного відтворення, гібриди співіснують з одним або обома батьківськими видами, або з іншими диплоїдними та поліплоїдними гібридами у популяційних системах. Це пов'язано з тим, що гібриди повинні формувати гамети і спаровуватися з тим батьківським видом, чий геном був елімінований, або з іншим гібридом, який елімінував протилежний геном [103, 9]. Проте відтворення не обмежується взаємодією гібридів із батьківськими видами. Інколи формуються чисто гібридні системи зелених жаб, де диплоїдні гібриди співіснують із триплоїдними. У таких системах різні гібриди можуть схрещуватися між собою, при цьому один із батьківських геномів елімінується під час гаметогенезу, а геном, який лишився, передається клонально [104]. Жаби *Pelophylax* – один з небагатьох відомих гібридів, який здатний утворювати самопідтримувані повністю гібридні популяції [105, 9]. Такий тип успадкування в межах триплоїдних популяцій описують як мейотичний або триплоїдний гібридогенез, який, на відміну від класичного диплоїдного гібридогенезу, поєднує елімінування одного геному з мейотичним паруванням та рекомбінацією дубльованих копій іншого [63]. Подібні мейотичні гібридогенні системи відомі не лише у жаб роду *Pelophylax*, але й у ропух *Bufo baturae* та у низки риб (*Squalius*, *Cobitis-Iksookimia*, *Misgurnus* та інші), що буде розглянуто нижче [106, 107, 108, 109, 110, 111, 112].

1.3.5 Гіногенез: типи, механізми, приклади

Гіногенез (також відомий як сперматозалежний партеногенез) – тип нестатевого розмноження, яким також передбачається виробництво клональних гамет, проте для запуску розвитку без каріогамії, тобто злиття ядер статевих клітин, потрібні сперматозоїди [113, 114, 115].

Гіногенез найчастіше спостерігається серед риб та інших водних тварин і є однією з найпоширеніших форм нестатевого розмноження у міжвидових гібридів [116]. У різних видів гіногенетичних риб цей тип розмноження може бути як єдиним способом відтворення популяції, так і поєднуватися з іншими видами розмноження [117, 118]. На відміну від партеногенезу, він обов'язково потребує присутності сперматозоїдів споріднених видів для активації яйцеклітини, хоча генетичний матеріал самця зазвичай не інтегрується в геном ембріона [119]. Зазвичай ДНК сперматозоїдів деградує ще до моменту каріогамії, що гарантує повну клональність нащадків, за винятком поодиноких випадків, коли невеликі фрагменти батьківського геному можуть зберігатися у вигляді мікрохромосом, які поводяться подібно до В-хромосом у соматичних і зародкових клітинах [120]. Запліднення яйцеклітини призводить до підвищення рівня плоідності та утворення нових триплоїдних ліній [119, 121, 122]. Триплоїдні гібриди зазвичай відтворюються шляхом гібридогенезу: у видів як, наприклад, *Squalius*, *Cobitis-Iksookimia* та *Misgurnus*, однокопійний геном батьківського виду елімінується, а подвійно скопійовані геноми проходять мейоз і утворюють гаплоїдні гамети [107, 108, 109, 110, 111, 112]. Такий механізм називають триплоїдним або мейотичним гібридогенезом [109]. Таким чином, елімінація однокопійного геному триплоїдами допомагає уникнути збільшення плоідності і утворення стерильних або нежиттєздатних гібридів.

Poecilia formosa

Серед прикладів гіногенезу у хребетних особливу увагу привертає амазонська пецилія (*Poecilia formosa*), представник родини *Poeciliidae*, яка виникла шляхом гібридизації *P. mexicana*, як предка по материнській лінії, та *P. latipinna*, як предка по батьківській лінії [123]. Усі сучасні популяції *P. formosa* походять від цього єдиного гібридного предка і складаються виключно з самок, які розмножуються гіногенетично, тобто використовують сперматозоїди самців споріднених видів лише для активації розвитку яйцеклітини без інтеграції чоловічого генетичного матеріалу [124]. Переважно всі клональні гібриди диплоїдні, проте інколи, коли механізм виключення сперматозоїдів повністю не працює, утворюється триплоїдна амазонська моллінезія, яка є стерильною [119, 121]. Цей вид вважається першим відомим природним хребетним гібридом з асексуальним розмноженням [113]. Як показано у низці досліджень, яйцеклітини *P. formosa* формуються шляхом модифікованого мейотичного поділу – так званого ахізматичного мейозу, у якому не відбувається формування бівалентів і не реалізується кросинговер [122, 125, 114, 126]. Цей механізм передбачає блокування синапсису на стадії пахітени, внаслідок чого редукційний поділ не реалізується повністю, а екваційний поділ відбувається подібно до мітозу, що дозволяє формувати диплоїдні яйцеклітини без рекомбінації [114, 122]. У яйцеклітині, коли вона вступає в контакт зі сперматозоїдом самця близького виду, сперматозоїд лише запускає розвиток, але його ДНК не інтегрується в зиготу [123]. Відповідно, усі нащадки є генетичними копіями матері, що забезпечує стабільність клональної популяції.

Комплекс *Carassius*

Раніше *Carassius langsdorfii* та *Carassius gibelio* розглядалися як підвиди або локальні форми *Carassius auratus*, однак сучасні філогеномні дослідження підтвердили їхнє окреме видове положення [117]. Походження комплексу *C. auratus* підтверджують з Китаю, звідки предкові популяції

поширилися на інші регіони Євразії внаслідок природних плейстоценових розселень, зумовлених палеокліматичними коливаннями та розвитком річкових систем, що текли на схід. Пізніше до цього додалися штучні переміщення людьми, які сприяли формуванню широкої зони вторинного контакту між різними лініями [127].

У межах комплексу *Carassius* сформувалися кілька гібридних ліній, серед яких *C. langsdorfii* і *C. gibelio* демонструють подібні цитологічні механізми гіногенезу. *Carassius langsdorfii*, або їх ще називають гінбунами, поширені переважно в Японії [128]. Гіногенетичне відтворення у триплоїдних популяцій цих карасів, супроводжується відмінним мейотичним механізмом, який забезпечує збереження повного набору хромосом у яйцеклітинах. Дослідження механізмів утворення нередукованих яйцеклітин Yamashita et al. (1993) [128] показало, що у гінбун під час мейозу I не відбувається очікуваного зменшення вмісту ДНК удвічі, що свідчить про пригнічення редукційного поділу. Цитологічні дослідження підтвердили, що мейоз I супроводжується формуванням триполярного веретена поділу, внаслідок чого перше полярне тільце не екструджується. Натомість під час мейозу II формується стандартне біполярне веретено, і відбувається екструзія другого полярного тільця. Тимчасове зниження рівня H1-кінази між мейозом I та II свідчить про проходження повного циклу мейотичного дозрівання, попри нетиповий хід першого поділу [128, 129]. Таким чином формується триплоїдна яйцеклітина.

У близького виду *C. gibelio*, який має євразійське походження та нині поширений від Китаю до Європи, мейоз проходить аналогічно до *Carassius langsdorfii*: редукційний поділ пригнічується завдяки формуванню триполярного веретена, що забезпечує утворення нередукованих гамет [129, 130]. Проте, на відміну від *P. formosa*, де синапсис і рекомбінація хромосом повністю пригнічені, у *C. gibelio* спостерігається часткове спарювання та рекомбінація хромосом принаймні між деякими

гомологічними хромосомами [128, 131]. До того ж *C. gibelio* характеризується ширшою репродуктивною гнучкістю: залежно від джерела сперми може реалізовувати як гіногенетичне, так і частково статеве або гібридоподібне розмноження [117]. Якщо яйцеклітина активується сперматозоїдом представника того ж самого клону, можливе відновлення нормального мейозу й відтворення статевим шляхом. У такому випадку відбувається рекомбінація, і нащадки успадковують гени обох батьків [19, 132]. Натомість при використанні сперми неспоріднених видів, таких як *Cyprinus carpio* або *Rutilus ylikiensis*, реалізується класичний гіногенез: сперма лише запускає розвиток яйцеклітини, не залишаючи генетичного сліду в зиготі [19, 132]. У випадку активації спермою іншого гібридного клону може мати місце проміжна стратегія – гібридоподібне розмноження, при якому спостерігаються незвичні поведінкові особливості хромосом, зокрема відокремлення батьківського хроматину і утворення хроматинового мосту [19, 132]. При цьому материнські хромосоми сегрегують нормально під час першого поділу зиготи, тож нащадки залишаються генетично ідентичними до матері, як і у випадку класичного гіногенезу.

Комплекс *Cobitis*

Серед щипавок (*Cobitis*) гібридизація, що призводить до появи клональних форм, є надзвичайно поширеним явищем. Три ключові європейські представники належать до комплексу *Cobitis sensu stricto*, поширеного переважно в Центральній та Східній Європі: *C. taenia* з диплоїдним каріотипом (TT), *C. tanaitica* (NN) та вид *C. elongatoides* (EE), який відокремився приблизно 9 мільйонів років тому [133, 134, 135]. Там, де ареали видів перекриваються, утворюються природні гібридні зони, у яких активно формуються численні диплоїдні та триплоїдні гібриди [136, 137]. Основний механізм розмноження у гібридних самиць типу ET (*C. elongatoides* × *C. taenia*) – гіногенез з премейотичною ендореплікацією геному. Цей механізм забезпечує формування клональних гамет як у

диплоїдних, так і у триплоїдних гібридів [137, 138]. Геном сперматозоїда при цьому не інкорпорується до зиготи, а елімінується після активації [136, 137, 138]. Однак у разі часткової або повної інкорпорації батьківського геному спорідненого виду, замість його елімінування, утворюються триплоїдні гібриди, такі як ЕТТ (*C. elongatoides-taenia*) та ЕЕН (*C. elongatoides-tanaitica*) [115, 133, 135]. Одна з успішних клональних ліній ЕЕН, яка здатна відтворювати таких же триплоїдів навіть колонізувала величезні території Європи з моменту свого давнього походження приблизно 300 тис. років тому [139].

Схрещування інших представників всередині комплексу *Cobitis* демонструють широкий спектр результатів: від повної стерильності до формування нередукованих гамет. Так, у гібридів ТР (*C. taenia* × *C. pontica*) самці виробляють редуковані сперматозоїди, а самиці – як редуковані, так і нередуковані яйцеклітини. У гібридів SE (*C. strumicae* × *C. elongatoides*) та SP (*C. strumicae* × *C. pontica*), які походять від більш генетично віддалених батьків, спостерігаються лише стерильні самці та гіногенетичні самиці [138].

Серед корейських представників виділяють комплекс *Cobitis hankugensis-Iksookimia longicorpa*. У цьому комплексі два диплоїдні парapatрично розподілені двостатеві види *C. hankugensis* (НН) та *I. longicorpa* (LL) зустрічаються в гібридній зоні та утворюють диплоїдні гібриди (HL) [108, 140]. Дослідження гаметогенезу у диплоїдних та триплоїдних безстатевих гібридів показало, що перемикання між безстатевим і статевим розмноженням гібридів комплексу *Cobitis hankugensis - Iksookimia longicorpa* може відбуватися миттєво залежно від рівня їхньої плоїдності [63]. У диплоїдних гібридних самиць звичайні диплоїдні ооцити не проходять стадію пахітени через аномальне спарювання хромосом, тоді як тетраплоїдні ооцити, що виникають після премейотичної ендореплікації геному, демонструють нормальний спаринг і завершують мейоз, утворюючи диплоїдні гамети [63]. Такий механізм

лежить в основі гіногенезу – клонального розмноження з утворенням нередукованих гамет.

Триплоїдні гібридні самиці розмножуються шляхом мейотичного гібридогенезу [63]. Вони не здатні до премейотичної ендореплікації, у них є інші зміни гаметогенезу, а саме премейотична елімінація однокопійного батьківського геному. Після цього між подвійно скопійованими геномами утворюються біваленти, що забезпечує прогрес через мейоз та формування редукованих рекомбінантних гаплоїдних гамет [107, 108, 63]. Гібридні самці триплоїдів зазнають повної стерильності: їхні сперматоцити демонструють порушене спарювання та нездатність до правильної хромосомної сегрегації під час мейозу [63].

Misgurnus anguillicaudatus

Вважається, що гібрид утворився шляхом схрещування двох батьківських видів в Азії, а з часом був завезений людьми до Японії, що наразі ускладнює встановлення видової приналежності батьків. Існують гіпотези, сформовані на основі повного дослідження мітохондріального геному, проте і вони зараз не є впевненими. Але вважається, що цей гібрид виник шляхом схрещування диплоїдної і триплоїдної особин [141]. Серед прісноводних риб *Misgurnus anguillicaudatus* існують як диплоїдні форми, що розмножуються в природі статеві, так і природні клональні лінії, що розмножуються шляхом гіногенезу [142,143].

Поліплоїди з парною кількістю гомологічних наборів хромосом (тетраплоїди, гексаплоїди) зазвичай фертильні завдяки утворенню бівалентів і квадριвалентів під час мейозу, що забезпечує правильний розподіл генетичного матеріалу [144]. Непарноплоїдні форми, як-от триплоїди, демонструють аберантні мейотичні конфігурації. Триплоїдний в'юн *Misgurnus anguillicaudatus* відкладає одночасно великі триплоїдні та малі гаплоїдні яйця, що свідчить про премейотичну ендореплікацію як у диплоїдних, так і у триплоїдних клональних лініях. За допомогою цитогенетичного дослідження незрілих яєчників триплоїдних самиць були

виявлені триплоїдні і гексаплоїдні метафази [145, 110, 146]. Дослідження дозрілих ооцитів, культивованих *in vitro*, засвідчило, що обидва типи клітин: і великі, і малі проходять звичайні два послідовні мейотичні поділи, включно з утворенням біполярного веретена, сегрегацією гомологічних хромосом, формуванням першого полярного тільця та ініціацією другого мейозу. Проте в малих ооцитах спостерігалися окремі хромосоми, які не залучалися до формування веретена поділу та залишалися в цитоплазмі [111]. Таким чином, великі триплоїдні яйцеклітини формуються з гексаплоїдних клітин, що виникають після премейотичного подвоєння геному. Натомість гаплоїдні гамети утворюються з малих триплоїдних ооцитів за рахунок елімінації зайвих унівалентів перед мейозом [111].

Squalius alburnoides

Комплекс *Squalius alburnoides* (плітки бистрянкові, що належать до роду Головень з родини Ялецеві, Leuciscidae) має гібридогенне походження і сформувався в результаті схрещування між самицями виду *Squalius pyrenaicus* та самцями іншого, нині вимерлого виду, який був поміщений до сестринського таксону *Anaescypris hispanic* [147]. Цей комплекс включає диплоїдні, триплоїдні та тетраплоїдні форми, походження яких пов'язане зі *S. pyrenaicus* або *S. carolitertii* та відсутнім предком [147, 148, 112]. Усі ці поліплоїди представлені як фертильними самцями, так і самками, здатними реалізовувати декілька типів відтворення. Особливо показовими є триплоїдні самки з південних популяцій, у яких спостерігається мейотичний гібридогенез, що супроводжується випадковою рекомбінацією та сегрегацією між невиключеними геномами [147, 149, 150]. Такий механізм призводить до формування переважно гаплоїдних, але також у деяких випадках диплоїдних яйцеклітин.

Диплоїдні самиці, своєю чергою, продукують переважно диплоїдні яйцеклітини. У 3% випадків такі яйця можуть активуватися без інкорпорації сперматозоїдного геному, тобто шляхом гіногенезу. Гіногенез є рідкісним явищем, яке спостерігається переважно тоді, коли у популяції

немає самців того самого виду, і активація яйцеклітин здійснюється сперматозоїдами споріднених видів [149, 150].

Chrosomus eos* × *eos-neogaeus

Гібридизація між північноамериканськими ялецевими рибами *C. eos* (E) та *C. neogaeus* (N) призвела до утворення диплоїдних гібридів (EN), що представлені лише самицями, здатними до гінтогенезу (Dawley et al., 1987). Запліднення здійснює лише тригерну функцію: у переважній більшості випадків гаплоїдний геном сперматозоїда деградує, не зливаючись із материнським пронуклеусом. Диплоїдні гібридні самки утворюють диплоїдні яйцеклітини, які розвиваються без участі батьківського геному. У результаті формується диплоїдна зигота, генетично ідентична до матері, тобто клональна [152, 78].

Однак, у частини випадків відбувається інтеграція батьківського геному до складу зиготи, що призводить до утворення триплоїдного потомства, яке несе один гаплоїдний геном від самця. Таким чином, диплоїдні гібридні самки мають здатність продукувати як диплоїдних, так і триплоїдних нащадків залежно від того, чи буде сперматозоїдний геном інкорпорований чи елімінований. Така варіативність гаметогенезу підтверджена низкою досліджень [151, 152, 153].

Триплоїдні гібриди демонструють два репродуктивні шляхи: амейотичний та мейотичний гібридогенез, що призводить до утворення диплоїдних та гаплоїдних яйцеклітин відповідно. У випадку амейотичного гібридогенезу, що характерний для первинних триплоїдів, відбувається елімінація одного з гаплоїдних геномів (зазвичай E) до початку мейозу. Як наслідок, диплоїдний геном (EN) передається клонально, з утворенням нередукованих яйцеклітин [154].

У випадку мейотичного гібридогенезу, що характерний для наступних генерацій триплоїдів, елімінується інший гаплоїдний компонент – N. Два гаплоїдні геноми *C. eos*, що залишилися, потім завершують мейоз і продукують гаплоїдні яйця, які потребують облігатного запліднення та

пронуклеарного злиття. Тобто цей тип гібридогенезу супроводжується мейотичною рекомбінацією та розривом клонального циклу, повертаючи генетичну лінію до статевого розмноження [154].

1.4 Гібридогенний комплекс риб роду *Fundulus*

Родина *Fundulidae*, що належить до ряду Коропозубоподібні (Cyprinodontiformes) поширена у Північній та Центральній Америці, налічує близько 42 видів, які мешкають у широкому діапазоні екологічних умов [11, 12, 155]. Найбільш вивченим серед всієї групи є *Fundulus heteroclitus*, проте упродовж останніх років дослідження сягнули і інших представників роду. Популярність цих риб як модельних організмів пояснюється значними відмінностями у стійкості до абіотичних факторів як між видами, так і всередині них, а також доступністю та простотою утримання в лабораторних умовах [10, 11, 12, 17].

Гібридизація серед різних представників роду *Fundulus* є досить поширеним явищем [10, 156], однак ці гібриди залишаються фертильними і розмножуються статеві [157]. І тільки гібриди між *F. diaphanus* та *F. heteroclitus* перейшли до гіногенезу, що порушив стерильність і дозволив їм самовідтворюватися [17]. Ці два види, які не є сестринськими, розійшлися приблизно 15–25 млн років тому [13]. *F. diaphanus* переважно населяє прісні води, тоді як *F. heteroclitus* – солонуваті та морські біотопи [158]. Популяції обох видів перетинаються у кількох регіонах Північної Америки, де й відбувається природна гібридизація [14, 16, 159, 160]. У річці Сент-Мері та озері Портер у Новій Шотландії природні диплоїдні гібриди F1 складають близько 10% популяції [16, 17, 161]. Рідше виявляють триплоїдних гібридів (<1%), які, ймовірно, утворюються при інтеграції сперматозоїдного геному в нередуковані клональні яйцеклітини [151].

Генетичні дослідження показали значну різноманітність клонів у цих популяціях. Генотипування гібридів з комбінацією восьми ядерних мікросателітних локусів та поліморфізму довжини рестрикційних

фрагментів у D-петлі мітохондріального геному дозволило Hernández Chávez і Turgeon (2007) виявити щонайменше чотири окремі клональні лінії як у озері Портерс, так і в річці Сент-Мері, що свідчить про багаторазове виникнення безстатевості в різних місцях [16]. Порівняння зразків 2017-2018 рр. із матеріалами 2004-2007 рр. підтвердило стабільне існування домінантної лінії упродовж понад десяти років, а також наявність похідних ліній, що з'явилися внаслідок мутацій. Виявлені також нові потенційні клони, деякі з яких містили алелі сучасних популяцій *F. diaphanus*, що вказує на рідкісне, але триваюче утворення нових гібридних клонів [162].

Більшість гібридів мають мітохондріальну ДНК *F. diaphanus* [16], і в нових вибірках 2017-2018 рр. цей показник становив 95,6% [162]. Оскільки лабораторні реверсивні схрещування обох видів дають життєздатне потомство [163, 14], таке переважання мітохондріального геному *F. diaphanus*, ймовірно, пояснюється передзиготичними бар'єрами (наприклад, вибором партнера), а не генетичною несумісністю [162]. І хоча більшість гібридів є клонами самиць, у деяких регіонах зафіксовано і статевих гібридів [16, 161]. Тому було висловлено припущення, що саме специфічні природні умови зумовлюють появу безстатевого потомства [16].

Механізми гаметогенезу у безстатевих гібридів роду *Fundulus* досі залишаються малодослідженими, на відміну від інших груп риб і амфібій, де цитогенетичні підходи дозволили описати утворення нередукованих гамет та механізми підтримання популяції.

У цій роботі ми досліджуємо особливості розмноження безстатевих природних і лабораторних (від різних схрещувань) клональних ліній *Fundulus* за допомогою комбінованих цитогенетичних методів. Використання сучасних методів флуоресцентної мікроскопії та специфічних ДНК-зондів може дати змогу вперше простежити особливості формування гамет і пояснити збереження клональної репродукції у цих гібридів.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Особистий внесок

Практична частина роботи проводилась у рамках стажування в Інституті фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чехія). Авторка роботи брала участь в проведенні імунофлуоресцентного фарбування хромосом на стадії пахітени, отримувала препарати мітотичних хромосом, виділяла ДНК, готувала зонди методом ПЛР та оцінювала їх якість за допомогою електрофорезу. Проводила флуоресцентну гібридизацію *in situ* та порівняльну геномну гібридизацію на препаратах мітотичних хромосом, а також імунофлуоресцентне фарбування на фрагментах гонад. Проводила флуоресцентну та конфокальну мікроскопію, а також обробку отриманих даних.

2.2 Збір матеріалу

Дикі особини *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* або їх природні гібриди збиралися влітку 2020, 2022, 2023 та 2024 років у озері Портера (Porters Lake), Нова Шотландія (44.68414, -63.30238) під наглядом Anne Dalziel та Anne-Marie Dion-Côté за дозволом на науковий збір риб Канадського департаменту рибальства та океанів. Тварин утримували в автономних резервуарах із солонуватою водою (10-12 ppt) при 18-21 °C до моменту розмноження (2020, 2022, 2023 роки) в Університеті Святої Марії у Галіфаксі, Нова Шотландія.

Усього було виловлено 18 особин *Fundulus diaphanus* (12 самиць і 4 самця), 16 особин *F. heteroclitus* (8 самиць та 5 самців) та 7 гібридів з природної нестатевої лінії (6 самиць, 1 самець). До того ж для роботи були взяті 4 самиці і 13 самців гібридів від схрещування самиці *F. diaphanus* × самця *F. heteroclitus* та 13 самиць і 7 самців гібридів від схрещування самиці *F. heteroclitus* × самця *F. diaphanus*.

2.3 Отримання мітотичних та мейотичних хромосом

Підготовка та фіксація тканин проводилася Дмитром Дідухом на основі Монктонського університету. За 12 годин до розтину кожній рибі було введено 200 мкл 0,05% колхіцину, який перешкоджає формуванню веретена поділу і зупиняє поділ клітин. Своєю чергою, молодих тварин занурювали у 0,2% колхіцин на 3-4 години. По завершенню цього часу тварини були еутанізовані та препаровані. Вирізані зябра і сім'яники поміщалися на 30 хв у дистильовану воду для створення гіпотонічних умов, що спричиняють набухання клітин. Після чого отримані тканини були перенесені в суміш етанолу з крижаною оцтовою кислотою в пропорції 3:1, де фіксувалися протягом 1 години. Розчин змінювався тричі кожні 30 хвилин. Далі дослідження проводилося авторкою роботи на базі Інституту генетики та фізіології тварин (Лібехов, Чехія). Фрагменти отриманих тканин мацерувалися в 70% розчині оцтової кислоти і отримана суспензія клітин була розподілена по попередньо нагрітих до 60°C предметних скельцях. Після висихання метафазні хромосоми фарбували 5% розчином Гімзи протягом 6-8 хвилин при кімнатній температурі для первинної оцінки числа хромосом, морфології та формування бівалентів [135].

2.4 Отримання пахітенових хромосом та імунофлуоресцентне забарвлення

Хромосомні препарати на стадії пахітени мейозу з тканин сім'яників дорослих самців за протоколом Moens (2006) та з яєчників ювенільних самиць за методикою Araya-Jaime et al. (2015) були отримані Дмитром Дідухом в Монктонському університеті (2024 рік) [164, 165].

Невеликий фрагмент тканини сім'яників гомогенізували в 200 мкл 1×PBS, тобто в фосфатно-сольового буферу. Потім 1 мкл клітинної суспензії додавали до 30 мкл гіпотонічного розчину (одна третина 1×PBS), попередньо нанесеного на предметне скельце SuperFrost®. Через 20 хвилин

клітини фіксували 2% параформальдегідом (PFA) протягом 4 хвилин і висушували за кімнатної температури.

Тканину яєчників гомогенізували в 0,2 М сахарозі. 20 мкл отриманої суспензії клітин наносили на скельця SuperFrost® (Menzel Gläser), після чого додавали 40 мкл 0,2 М сахарози та 40 мкл 0,2% Triton X-100 на 7 хвилин. Клітини фіксували шляхом додавання 400 мкл 2% PFA на 16 хвилин і висушували на повітрі. Отримані просушені скельця поміщали в 1×PBS і використовували для імунофлуоресцентного забарвлення.

Подальша частина виконувалася авторкою роботи спільно з Дмитром Дідухом на базі Інституту генетики і фізіології тварин (Лібехов, Чехія). Для виявлення компонентів синаптонемального комплексу використовували поліклональні кролячі антитіла (ab14206, Abcam) проти білка SYCP3, щоб виявити латеральні елементи. А для виявлення центрального елемента синаптонемального комплексу, використовували курячі поліклональні антитіла проти SYCP1 (виготовлені в лабораторії Sean M. Burgess, коледж біологічних наук Каліфорнійського університету, Девіс, США). Курячі антитіла були спрямовані проти N-кінцевої ділянки (1-408) білка SYCP1 риби *Danio rerio* [166, 167]. Комбінація SYCP3 та SYCP1 дозволяє розрізняти біваленти й уніваленти. В той час як SYCP3 присутній як в унівалентах, так і у бівалентах, білок SYCP1 накопичується лише у бівалентах [115, 168]. Локуси з рекомбінацією виявляли за допомогою кролячих поліклональних антитіл проти MLH1 (ab15093, Abcam, Кембридж, Велика Британія), а дволанцюгові розриви – мишачими моноклональними антитілами проти Rad51 рекомбінази (GTX00721, GeneTex, Ірвайн, США).

Свіжі скельця з синаптонемальними комплексами обробляли протягом 20 хв 1% розчином BSA (Roche), який містив 1×PBS і 0,01% Tween-20. Після цього скельця інкубували з первинними антитілами протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після трьох промивань у 1×PBS протягом 5 хв за кімнатної температури наносили вторинні

антитіла: Alexa-488-кон'юговані козячі антитіла проти кролячого IgG (H+L) (A-11008, Thermo Fisher Scientific), Alexa-594-кон'юговані антитіла проти курячого IgY (H+L) (A-11042, Thermo Fisher Scientific) та Alexa-594-кон'юговані антитіла проти мишачого IgG (H+L) (A-11005, Thermo Fisher Scientific), і залишали на 1 годину при кімнатній температурі. По завершенню часу скельця промивали в 1×PBS, зневоднено в трьох розчинах етанолу (5%, 70% та 96%) і висушено за кімнатної температури. На сухі препарати наносили флуоресцентний барвник DAPI (4',6-діамідіно-2-феніліндол) з антифотозгасальним реагентом DABCO (Vector, США).

2.5 Виділення ДНК

ДНК було виділено авторкою роботи з невеличких шматочків (до 25 мг) тканин риб *F. diaphanus* та *F. heteroclitus* з використанням комерційного набору для виділення ДНК (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Netherlands), дотримуючись протоколу виробника. 180 мкл буферу ATL додавали до подрібненого фрагмента тканини в 1,5 мл мікропробірці. До суміші додавали 20 мкл протеїнази К, перемішували на вортексі та інкубували при 56 °C до повного лізису тканини за допомогою термошейкеру.

Для видалення РНК додавали 4 мкл RNase A (100 мг/мл), змішували та інкубували при кімнатній температурі протягом 2 хвилин. Далі до лізату додавали 200 мкл буфера AL, перемішували за допомогою вортексу, після чого додавали 200 мкл 96% етанолу та знову перемішували за допомогою вортексу до утворення однорідної суспензії. Отриману суспензію (разом із можливими осадами) центрифугували при $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm (rotation per minute)) протягом 1 хвилини. Рідину обережно зливали, не чіпаючи осад.

До осаду додавали 500 мкл буфера AW1 і центрифугували 1 хвилину при $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm), потім повторювали промивання з 500 мкл буфера AW2, центрифугуючи 3 хвилини при $20\,000 \times g$ (14,000 rpm), і видаляли зайву рідину, не чіпаючи осад. Після просушування ДНК, ми додали до неї

200 мкл буфера АЕ та інкубували 1 хвилину при кімнатній температурі. Отриману ДНК зберігали при -20 °С до подальшого використання.

2.6 Приготування зондів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і електрофорез

На основі результатів секвенування, виконаних Анною-Марією Діон-Коте разом з Університетом Святої Марії (Галіфакс), було використано інструмент TAREAN repeat searcher [169] для пошуку потенційних видоспецифічних тандемних повторів. Для кожного виду Дмитро Дідух відібрав по 4 видоспецифічні повтори з найвищим рівнем достовірності (SatFH121, SatFH42, SatFH56, SatFH213 для *F. heteroclitus* та SatFD150, SatFD207, SatFD95, SatFD207 для *F. diaphanus*). Для картування цих повторів на хромосомах було використано два типи зондів: короткі олігозонди довжиною приблизно 50 п.н., кон'юговані з біотином або дигоксигеніном, та довгі послідовності, мічені біотином або дигоксигеніном за допомогою ПЛР. Праймери для ПЛР були розроблені за допомогою програмного забезпечення BLAST для мономера кожного повтору. Праймери та олігопроби були синтезовані комерційно у компанії KRD (Чехія), що є частиною Integrated DNA Technologies, Inc., США.

Приготування зондів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і електрофорез виконувала авторка. Для проведення ПЛР використовували 2 мкл буферу для ПЛР із MgCl₂, 2 мкл dNTP, 0,7 мкл біотин-16-dUTP/дигоксигенін-11-dUTP (Roche), 0,8 мкл енхансеру, 0,5 мкл ДНК-полімерази, яку додавали в самому кінці, 1 мкл ДНК *F. diaphanus* або *F. heteroclitus*, усю суміш доводили до 20 мкл дистильованою водою.

Ампліфікацію ДНК проводили у термоциклері за наступною програмою: початкову денатурацію здійснювали при 95 °С протягом 5 хв для повного розплетення дволанцюгової ДНК, після чого виконували 35 циклів, кожен з яких складався з денатурації при 95 °С упродовж 1 хв, відпалу праймерів при 59 °С протягом 45 с та елонгації при 72 °С

упродовж 1 хв. Завершальну елонгацію проводили при 72 °C протягом 6 хв, після чого реакційну суміш охолоджували до 4 °C.

Електрофоретичне розділення отриманих шляхом ПЛР послідовностей з ДНК обох видів проводили у 75 мл 0,8% агарозному гелі (0,8 г агарози розчинені у 100 мл трисЕДТАборатному електродному буфері) з 3 мкл етидію броміду протягом 30 хв у горизонтальній камері Scie-Plas під напругою 80V. Гелі фотографували в ультрафіолетовому освітленні за допомогою трансільюмінатора (Camag Reprostar II, Camag, Швейцарія). Доріжки порівнювалися з контролем (1 мкл) (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

2.7 Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH)

FISH проводила авторка роботи відповідно до протоколу Marta et al. (2020) [170]. Предметні скельця обробляли 0,01% пепсином у 0,01 М HCl протягом 10 хвилин, після чого промивали у 1×PBS, дегідратували в трьох розчинах етанолу (50%, 70% та 96%) і висушували на повітрі. Отримані зонди (1,5 мкл кожного міченого зонда/10 мкл гібридизаційної суміші) були додані до гібридизаційної суміші (суміш з 50% формаміду, 2×SSC, 1 мікрограм/мкл ДНК сперми лосося, 10% декстран сульфату,). Гібридизаційну суміш денатурували при 86 °C протягом 6 хвилин і охолоджували на льоду протягом 10 хвилин.

Водночас предметні скельця денатурували в нагрітому до 73 °C 75% формаміді/2×SSC протягом 3 хвилин, після чого негайно переносили у холодний етанол (70%, 80% та 96%) та висушували. 20 мкл гібридизаційної суміші з денатованим зондом наносили на висушене скельце, покривали покривним склом і інкубували при кімнатній температурі протягом ночі у вологій камері. Після гібридизації скельця промивали тричі у 2×SSC при 44 °C по 5 хвилин.

Біотин був виявлений за допомогою авідину, кон'югованого з флюорохромом Alexa 488 (S11223, Invitrogen). Дигоксигенін виявляли за допомогою анти-дигоксигеніну, кон'югованого з флюорохромним

родаміном (11207750910, Merck, Німеччина). Первинні кон'югати розводили у блокуючому розчині на основі BSA (1% BSA у 1×PBS) для зменшення неспецифічного зв'язування та забезпечення стабільної інкубації антитіл. Після цього предметі скельця були промиті в 4×SSC за температури 44 °C впродовж 5 хв кожен, послідовно зневоднені по 3 хв у трьох розчинах етанолу (50%, 70% і 96%), а потім висушені за кімнатної температури. Далі, на слайди наносили захисний розчин DABCO (1,4-діазабіцикло[2.2.2]октан), що містив 1 мкг/мл DAPI (Vector, Burlingame, Каліфорнія, США).

2.8 Порівняльна гібридизація геномів (CGH)

CGH проводила авторка роботи на мітотичних і мейотичних метафазних препаратах природних гібридів ($n = 7$) та F1 гібридів ($n = 10$) відповідно до протоколу Majtánová et al. (2016) [135]. Зонди для CGH були приготовані з повної геномної ДНК чистих батьківських видів *F. diaphanus* та *F. heteroclitus*. За допомогою протоколу виробника і набору Nick Translation Mix (Abbott) геномну ДНК *F. diaphanus* мічено біотин-16-dUTP (Roche, Німеччина), а ДНК *F. heteroclitus* – дигоксигенін-11-dUTP (Roche, Німеччина). Оптимальні мічені фрагменти розміром близько 200–500 п.н. були досягнені за 2,5 годин реакції.

Продукти Nick-трансляції (по 1 мкг кожного міченого зонда) після етанольного осадження змішували та розчиняли в 100 мкл гібридизаційної суміші (суміш з 50% формаміду, 2×SSC, 1 мікрограм/мкл ДНК сперми лосося, 10% декстран сульфату). Денатурація предметних скелець і зондів проводилася аналогічно до протоколу FISH. Гібридизаційну суміш денатурували при 86 °C протягом 6 хвилин і охолоджували на льоду протягом 10 хвилин.

У той же час предметні скельця денатурували в нагрітому до 73 °C 75% формаміді/2× SSC протягом 3 хвилин, після чого негайно переносили у холодний етанол (70%, 80% та 96%) та висушували. Денатурований зонд

наносили на висушене скельце, покривали покривним склом і інкубували при 37 °C протягом 48 годин у вологій камері. Після гібридизації скельця промивали тричі у 4×SSC при 50 °C по 5 хвилин.

Детекцію проводили аналогічно до FISH-протоколу: для візуалізації біотин-міченої ДНК використовували стрептавідин-Alexa 488 (Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США), а для дигоксигенін-міченої – антитіла анти-дигоксигенін-родамін (Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Після трьохкратних промивок по 5 хв в 4×SSC за температури 44 °C та зневоднення в трьох розчинах етанолу (50%, 70% і 96%) по 3 хв кожен, висушування за кімнатної температури, на слайди наносили захисний розчин DABCO, що містив 1 мкг/мл DAPI (Vector, Burlingame, Каліфорнія, США).

2.9 Імунофлуоресцентне забарвлення цілих гонад

Для дослідження тканин гонад методом імунофлуоресценції авторка разом з Дмитром Дідухом використовували протокол, описаний Dedukh et al. (2021) [137]. Фрагменти гонад перед фарбуванням обробляли в розчині 0,5% Triton X-100 у 1×PBS протягом 4–5 годин при кімнатній температурі, після чого промивали у 1×PBS. Зразки інкубували протягом 1-2 годин в блокуючому розчині (1% блокувальний реагент (Roche) у 1×PBS), після чого переносили в свіжий буфер з додаванням первинних антитіл.

У якості первинних антитіл застосовували мишачі моноклональні антитіла до α -тубуліну (ab7291, Abcam) для візуалізації мікротрубочок, а також кролячі поліклональні антитіла DDX4 (C1C3, GeneTex Inc., Irvine, CA, USA) для детекції білка Vasa, що накопичується в кластерах гоноцитів. Після інкубації при кімнатній температурі протягом ночі тканини промивали 1×PBS і інкубували з вторинними антитілами за кімнатної температури протягом ночі: Alexa-488-кон'югованими козячими антитілами проти кролячого IgG (H+L) (A-11008, Thermo Fisher Scientific) і Alexa-594-кон'югованими козячими антитілами проти мишачого IgG (H+L)

(A-11005, Thermo Fisher Scientific). Після завершення інкубації тканини промивали 1×PBS і фарбували DAPI (1 мкг/мкл у PBS) при кімнатній температурі впродовж ночі.

2.10 Світлова, флуоресцентна та конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія та обробка фотографій

Препарати з хромосомами у мітозі та мейозі досліджувалися авторкою за допомогою флуоресцентного мікроскопа ZEISS Axio Imager.Z2, оснащеного CCD-камерами Olympus DP30BW та CoolCube 1 (MetaSystems, Altlussheim, Німеччина). Аналіз сірошкальних зображень здійснювали з використанням програмного забезпечення IKAROS і ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Німеччина). Фотографії, отримані після FISH, CGH та імунофлуоресцентного забарвлення обробляли методом псевдозабарвлення (DAPI - синій, анти-дигоксегінін-родамін – червоний, стрептавідин-FITC – зелений), а накладання каналів виконували за допомогою Microimage та Adobe Photoshop.

Препарати з синаптонемальними комплексами та диплотенними хромосомами вивчалися на мікроскопах Provis AX70 (Olympus), обладнаних стандартними флуоресцентними фільтрами. Зображення хромосом отримували з використанням камери DP30W та програмного забезпечення Olympus Acquisition Software.

Авторка даної роботи спостерігала за конфокальною мікроскопією, яку проводив Дмитро Дідух на мікроскопі Leica TCS SP5, інтегрованому із мікроскопом Leica DMI 6000 CS (Leica Microsystems, Німеччина). Для візуалізації використовувався об'єктив HC PL APO 63×. Збудження флуорофорів (DAPI, Alexa-488, Alexa-594) здійснювали за допомогою аргонного та діодного лазерів. Зображення збирали та обробляли у програмному середовищі LAS AF (Leica Microsystems).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Каріотипування та FISH-картування

У соматичних клітинах представників видів *Fundulus diaphanus* і *F. heteroclitus* виявлено диплоїдний набір хромосом ($2n = 48$), як і було заявлено в попередніх дослідженнях [162]. Такий же набір був зафіксований у лабораторних F1-гібридів і природних гібридів. Методом CGH вдалося чітко ідентифікувати хромосомні набори кожного з батьків у лабораторних F1 і природних диплоїдних гібридів (Рис. 3.1). Яскраві сигнали були зосереджені у HD та DH гібридів у центромерних і субтеломерних ділянках хромосом *F. diaphanus* and *F. heteroclitus*, що свідчить про видові відмінності в структурах повторів у цих ділянках (Рис. 3.1А, Б). CGH-аналіз показав, що у гібридів як природного, так і лабораторного походження відсутні інтрогресії чи значні хромосомні перебудови, тобто батьківські геноми зберігають цілісність у процесі клонального відтворення (Рис. 3.1В, Г). До того ж аналіз клітин сім'яників самців гібридів за допомогою CGH виявив мейотичні метафази з аномальною кон'югацією хромосом *F. diaphanus* та *F. heteroclitus* (Рис. 3.1В, Г). Були показані метафази з сумішшю бівалентів і унівалентів, причому частина бівалентів несла сигнали від обох батьківських геномів (Рис. 3.1В, Г). За результатами CGH було виділено кілька типів хромосом: (1) уніваленти із сигналами лише від одного батьківського виду *F. diaphanus*; (2) уніваленти із сигналами від іншого батьківського виду *F. heteroclitus*; (3) біваленти з подвійними сигналами, що свідчило про можливу присутність хромосом обох геномів.

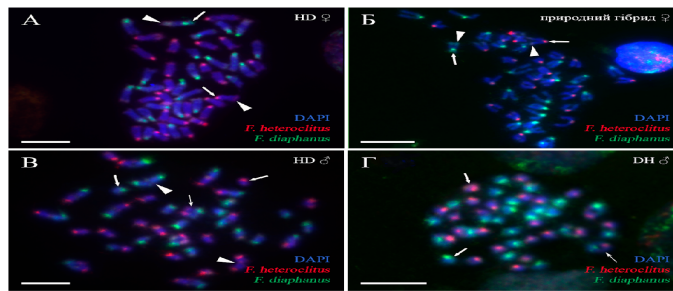


Рис. 3.1. Порівняльна геномна гібридизація демонструє вибіркове фарбування батьківських геномів на мітотичних хромосомах (А, Б) та мейотичних хромосомах (В, Г). Обидва батьківські геноми чітко розрізняються в мітотичних метафазах лабораторних гібридів (А) і природних гібридів (Б), що свідчить про накопичення видоспецифічних повторів у перицентромерних ділянках (позначено стрілками) та у субтеломерних ділянках деяких хромосом (позначено трикутниками). Метафази I мейозу самців лабораторних гібридів (В, Г) характеризуються порушеннями кон'югації хромосом: спостерігаються уніваленти (позначені стрілками), біваленти (позначені трикутниками), а також біваленти, утворені між хромосомами *F. heteroclitus* та *F. diaphanus* (позначені тонкими стрілками). Червоний флуоресцентний сигнал відповідає геномній ДНК *F. heteroclitus*; зелений - геномній ДНК *F. diaphanus*. Масштабна лінійка = 10 мкм.

Подальше FISH- картування виявлених тандемних повторів за допомогою TAREAN підтвердило специфічність окремих сателітних послідовностей для кожного з видів. Передбачалося, що послідовності SatFH121, SatFH42, SatFH56 та SatFH213 будуть специфічними для *F. heteroclitus*, тоді як SatFD150, SatFD233, SatFD95 та SatFD207 -

специфічними для *F. diaphanus*. Спершу ми виконали FISH з використанням ПЛР-мічених зондів, проте вони не дали специфічного сигналу. Тому для подальшого картування ми використовували лише олігозонди. Характерними для *F. heteroclitus* виявилися послідовності SatFH42 і SatFH56, тоді як зонди SatFH121 і SatFH213 не дали специфічного сигналу. Зокрема, SatFH42 демонстрував інтенсивні флуоресцентні сигнали в центромерних ділянках 12 пар хромосом, у чотирьох парах – із помірними сигналами у перичентромерних ділянках, тоді як у восьми парах жодного сигналу не зафіксовано (Рис. 3.2А). Повтор SatFH56 демонстрував інтенсивні сигнали у перичентромерних ділянках однієї хромосомної пари, а також слабші сигнали у перичентромерних ділянках у трьох додаткових парах (Рис. 3.2Б). Двоколірне FISH- картування із SatFH42 та SatFH56 для *F. heteroclitus* не показало накладання сигналів (Рис. 3.2В). Проведене картування SatFH42 (Рис. 3.2Г, Д) і SatFH56 (не показано) на хромосомах *F. diaphanus* не показало жодних сигналів, що свідчить про специфічність цих повторів для *F. heteroclitus*.

Для *F. diaphanus* були залишені послідовності SatFD95 і SatFD207, оскільки, на відміну від послідовностей SatFD150 та SatFD233, вони дали специфічні сигнали. Повтор SatFD95 демонстрував інтенсивне світіння в перичентромерних ділянках однієї пари хромосом, а також слабкий сигнал у ще одній парі (Рис. 2Г). Повтор SatFD207 локалізувався в інтерстиціальних частинах двох пар хромосом із яскравими сигналами (Рис. 3.2Д). Двоколірне FISH- картування з використанням SatFD95 і SatFD207 на хромосомах *F. diaphanus* не показало накладання (Рис. 3.2Е). Картування SatFD95 (Рис. 3.2А, Б) і SatFD207 (не показано) на хромосомах *F. heteroclitus* не показало жодних сигналів, що свідчить про специфічність цих повторів для *F. heteroclitus*.

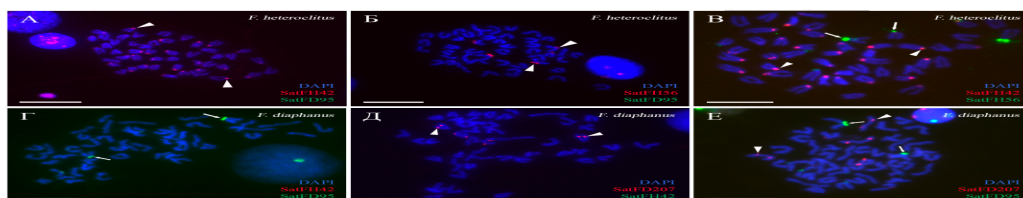


Рис. 3.2. Розподіл видоспецифічної сателітної ДНК у батьківських видів *F. heteroclitus* (А, Б, В) та *F. diaphanus* (Г, Д, Е), виявлений за допомогою FISH. (А) SatFH42 демонструє 12 яскравих і 4 слабкі сигнали в перицентромерних ділянках хромосом у *F. heteroclitus*; (Б) SatFH56 демонструє інтенсивні сигнали в перицентромерних ділянках однієї пари хромосом, і слабші сигнали у трьох додаткових парах хромосом у *F. heteroclitus*; (Г) SatFD95 показує 2 сильні та 2 слабких сигналів у перицентромерних ділянках двох пар хромосом у *F. diaphanus*; SatFD207 дає яскраві сигнали в інтерстиціальних ділянках двох пар хромосом у *F. diaphanus*; (В, Е) Подвійне флуоресцентне фарбування показує локалізацію SatFH42, SatFH56, SatFD207 і SatFD95 на мітотичних хромосомах відповідних статевих видів і їхніх гібридів. Стрілки вказують на сигнали з прив'язкою до кольору: трикутники - на червоні сигнали, стрілки - на зелені. Масштабна лінійка = 10 мкм.

FISH- картування повторів SatFD95 і SatFD207, а також SatFH42 і SatFH56 також ставилися на хромосомних препаратах F1-гібридів і природних гібридів (Рис. 3.3). У порівнянні з розподілом видоспецифічної сателітної ДНК у батьківських видів (Рис. 3.2), кількість сигналів у хромосомах гібридів виявилася приблизно удвічі меншою (Рис. 3.3), що відображає їхній змішаний гібридний склад. Як у природних, так і у лабораторних гібридів F1 зонди SatFH42 (Рис. 3.3А, Д, Г, Ж) і SatFD207 (Рис. 3.3В, Є, Г, Ж) у будь-якій комбінації проявляли подібні сигнальні патерни. Водночас зонд SatFH56 у природних гібридів демонстрував лише два яскравих сигнали (Рис. 3.3Б, В), тоді як у F1 їх було три (Рис. 3.3Е, Є).

В свою чергу зонд SatFD95 маркував чотири хромосоми як у лабораторних гібридів, так і у природних гібридів (Рис. 3.3А, Б, Д, Е). Цікаво, що у природних форм зонд SatFD95 колокалізувався із SatFH56 на одній парі хромосом і ще одна пара містила сигнали виключно для SatFH56 (Рис. 3.3Б), що ніколи не спостерігалось ні у гібридів F1, ні у батьківських видів. Тож, розташування сигналів SatFD95 і SatFH56 у природних гібридів відрізняється порівняно з лабораторними F1 та вихідними батьківським видами.

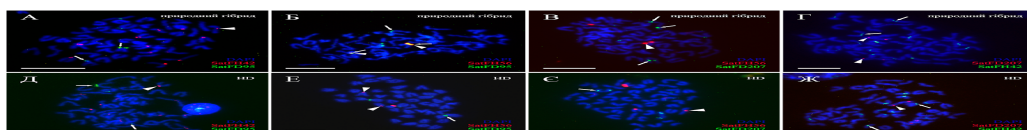


Рис. 3.3. Розподіл видоспецифічної сателітної ДНК у природних гібридів (А-Г) та лабораторних гібридів F1 (Д-Ж) риб роду *Fundulus*, виявлений за допомогою FISH. (А, В, Г, Д, Е, Ж) SatFD207 і SatFH42 було виявлено на двох і шістнадцяти хромосомах відповідно; (Б,В,Е,Є) SatFH56 позначає різну кількість хромосом в залежності від походження гібрида: у природних - дві хромосоми, у лабораторних - три; (А, Б, Д, Е) Сигнали SatFD95 було виявлено на чотирьох хромосомах, причому у природного гібрида два з них колокалізувалися із SatFH56 (позначено обома типами стрілок на Рис. 3Б). Стрілки вказують на сигнали з прив'язкою до кольору: трикутники - на червоні сигнали, стрілки - на зелені. Масштабна лінійка = 10 мкм.

3.2 Гібридні самці демонструють порушення гаметогенезу, тоді як гібридні самки мають морфологію гонад, подібну до батьківських видів

Задля вивчення гаметогенезу ми дослідили мікроанатомічну будову гонад за допомогою конфокальної мікроскопії. Ми виявили гоноцити,

мейоцити та гамети у самців і самиць батьківських видів *F. diaphanus* та *F. heteroclitus*, а також у гібридів з природних популяцій та отриманих шляхом штучних схрещувань (Рис. 3.4).

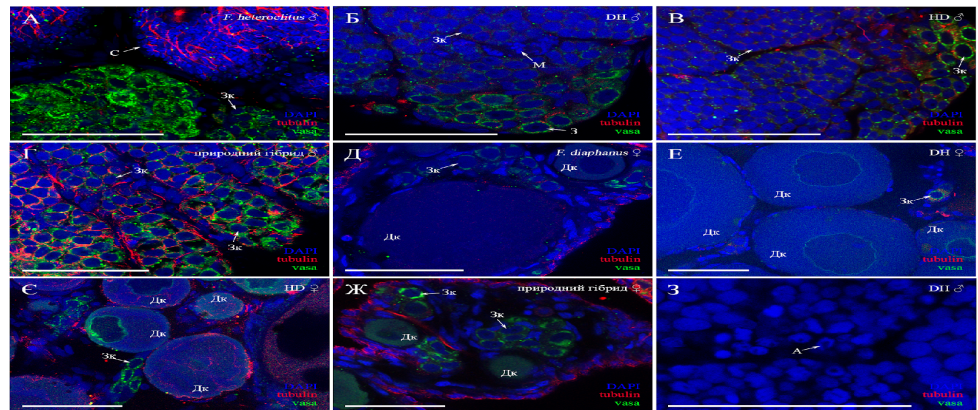


Рис. 3.4. Мікроанатомія гонад у батьківських видів (А, Д), лабораторних F1 гібридів (Б, В, Е, Є, З) та природних гібридів (Г, Ж). Імунофлуоресцентне фарбування з використанням антитіл проти білка Vasa (зелений) для візуалізації зародкових клітин (Зк), тубуліну (червоний) для візуалізації мікротрубочок та DAPI для фарбування хроматину (синій). (А) Статевий самець *F. heteroclitus*; (Б) гібридний самець DH; (В) гібридний самець HD; (Г) природний гібридний самець; (Д) статеві самиці *F. diaphanus*; (Е) гібридна самиця DH; (Є) гібридна самиця HD; (Ж) природна гібридна самиця; (З) гібридний самець DH. За морфологією ядер визначено кілька типів клітин зародкової лінії: С - сперматиди; Зк - зародкові клітини; М - метафазні пластинки під час першої метафази мейозу; Дк - клітини на стадії диплотени мейотичного поділу; А - апоптичні клітини. Масштабна лінійка = 50 мкм.

Зародкові клітини візуалізували імунофлуоресцентним забарвленням білка Vasa, який сильно експресується в цих клітинах і широко застосовується для їхньої ідентифікації [171, 172]. Крім того, типи зародкових клітин у самців і самиць розрізняли за ядерною морфологією

після фарбування DAPI, що відповідає раніше опублікованим результатам досліджень для *Cobitis* та *Hypseleotris* [137, 173].

У самиць *F. diaphanus* та *F. heteroclitus* ми спостерігали гоноцити й кластери клітин на стадії пахітени, розташовані між превітелогенними та вітелогенними ооцитами (Рис. 3.4Д). Таку ж саму картину ми спостерігали у самиць природних гібридів і у гібридів (обох типів: HD і DH) отриманих шляхом штучних схрещувань, що свідчить про їх потенційну фертильність (Рис. 3.4Е, Є, Ж).

У самців обох батьківських видів спостерігалися гоноцити, сперматоцити на стадії пахітени, сперматоцити на стадії метафази I і великі скупчення сперматид (Рис. 3.4А). У лабораторних гібридних самців F1 обох типів (HD і DH) також були присутні гоноцити, клітини на стадії пахітени та численні клітини на стадії метафази I, але сперматид не виявили, що може вказувати на їх стерильність (Рис. 3.4Б, В). Крім того, у тканинах було відмічено скупчення клітин з атиповим хроматином, що, ймовірно, свідчить про апоптоз (Рис. 3.4З). Водночас частина сперматоцитів метафази I не мала зміщених унівалентів і, ймовірно, здійснювала правильну сегрегацію. Аналіз єдиного природного гібридного самця показав подібну до лабораторних гібридів картину і також може свідчити про знижену фертильність або стерильність (Рис. 3.4Г).

3.3 Мейотичні особливості та премейотична ендореplikація у *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* та їх природних гібридів

Ми проаналізували хромосоми стадії пахітени мейозу у чотирьох самців і п'яти самиць *F. diaphanus*, а також у чотирьох самців і шести самиць *F. heteroclitus* (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

Загальна кількість проаналізованих тварин

	Стать	Вік	Кіль-кість	Методи дослідження тварин					
				FISH	CGH		Пахитени		Мікро-анатомія гонад
				Соматичні тканини	Соматичні тканини	Тканини гонад	Взагалі	3 ендо-реплікацією	Імунофлуоресцентне забарвлення (Vasa, тубулін)
<i>F. diaphanus</i>	Самці	дорослі	5	3	-	-	4	0	2
		молоді	0	-	-	-	-	-	-
	Самиці	дорослі	11	7	-	-	5	0	3
		молоді	0	-	-	-	-	-	-
<i>F. heteroclitus</i>	Самці	дорослі	4	3	-	-	4	0	4
		молоді	1	-	-	-	-	-	1
	Самиці	дорослі	11	8	-	-	5	0	4
		молоді	3	-	-	-	1	0	1
Природні гібриди	Самці	дорослі	1	1	1	1	1	0	1
		молоді	0	-	-	-	-	-	-
	Самиці	дорослі	6	5	3		4	4	4
		молоді	0	-	-	-	-	-	-
Лабораторні гібриди	Самці DH	дорослі	3	3	3	3	3	0	3
		молоді	10	2	-	-	3	0	6
	Самиці DH	дорослі	0	-	-	-	-	-	-
		молоді	10	2	1		10	5	5
	Самці HD	дорослі	4	3	3	3	4	0	3
		молоді	3	1	-	-	1	0	2
	Самиці HD	дорослі	0	-	-	-	-	-	-
		молоді	14	6	2		10	2	9
	Невизначені молоді особини		6	2	-	-	1	0	3

Щоб підтвердити формування бівалентів у статевих видів, було проведено імунофлуоресцентне забарвлення осьових (SYCP1) та бічних (SYCP3) елементів синаптонемального комплексу (Рис. 3.5А, Б, В, Г). У

батьківських видів обох статей було по 24 біваленти, що узгоджується з даними аналізу мітотичних хромосом (Рис. 3.2). На препаратах хромосом на стадії пахітени мейозу в обох статей були візуалізовані локуси кросинговеру за допомогою імунодетекції білка MLH1: принаймні один сигнал спостерігався на кожному біваленті (Рис. 3.5Д). Додатково було проведено виявлення двониткових розривів за допомогою імунодетекції білка Rad51 (Рис. 3.5Е). У ранній пахітені Rad51 інтенсивно локалізувався вздовж синаптонемного комплексу, але його сигнали зменшувалися на пізніших етапах пахітени, що відповідає нормальній репарації дволанцюгових розривів [122].

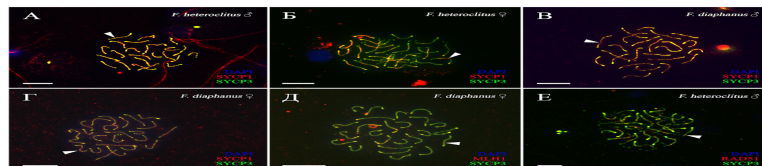


Рис. 3.5. Аналіз спарювання хромосом у пахітених ооцитах та сперматоцитах статевих особин *F. diaphanus* та *F. heteroclitus*. Синаптонемальні комплекси були візуалізовані за допомогою імунофарбування латеральних (білок SYCP3, зелений) і центральних (білок SYCP1, червоний) компонентів; Білки SYCP3 і SYCP1 (позначено трикутниками) накопичуються на бівалентах (А, Б, В, Г); локуси рекомбінації ідентифіковані за допомогою антитіл до MLH1 (позначено трикутником на Д); дволанцюгові розриви – за допомогою антитіл до Rad51 (позначено трикутником на Е); хроматин пофарбовано DAPI (синій). Масштабна лінійка = 10 мкм.

Також був проаналізований синапсис у чотирьох самиць і одного самця природних гібридів на стадії пахітени (Рис. 3.6).

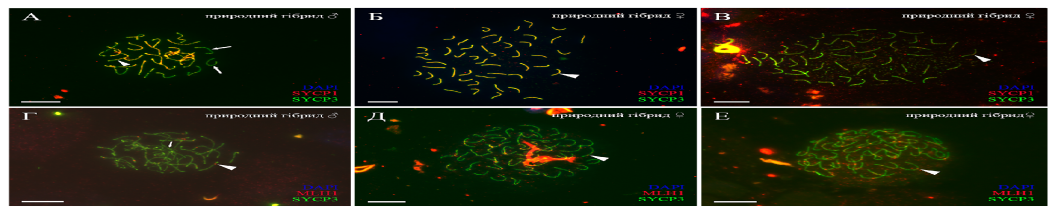


Рис. 3.6. Аналіз спарювання хромосом у пахітенних ооцитах та сперматоцитах природних гібридів (А-Е). Синаптонемні комплекси були візуалізовані за допомогою білка SYCP3 (зелений, латеральний елемент) і білка SYCP1 (червоний, центральний елемент), біваленти позначено трикутниками, унівальенти – стрілками (А-В); локуси рекомбінації ідентифіковані за допомогою антитіл до MLH1 (трикутники на Г-Е); хроматин пофарбовано DAPI (синій). Масштабна лінійка = 10 мкм.

Серед 193 проаналізованих пахітенних ооцитів від чотирьох самиць 78% зберігали диплоїдний рівень плоїдності, тоді як 22% мали тетраплоїдний геном. У диплоїдних ооцитах спостерігалось звичайне формування бівалентів, проте частина хромосом залишалися неспареними (унівальентами). Локуси MLH1 були очікувано знайдені лише на бівалентах і відсутніми на унівальентах і неспарених ділянках (Рис. 3.6Г, Д, Е). Через методологічні труднощі сигнали Rad51 у тетраплоїдних клітинах не були зафіксовані.

У тетраплоїдних ооцитах спостерігалось формування 48 бівалентів без ознак аномального спарювання чи утворення унівальентів (Рис. 3.6Б, В). Оскільки кількість хромосом у цих клітинах становила $4n = 86$, їхній тетраплоїдний стан, ймовірно, є результатом премейотичної ендореплікації

геному в ході гаметогенезу. Локус MLH1 у природних гібридних самиць був виявлений на кожному біваленті, що підтверджує ефективне спарювання (Рис. 3.6Д, Е).

На відміну від самиць, у клітинах єдиного диплоїдного гібридного самця, походженням із природної популяції не спостерігалось подвоєння геномів – усі сперматоцити зберігали диплоїдний набір хромосом (Рис. 3.6А). Водночас зафіксовано порушення хромосомного спарювання на стадії пахітени: не всі хромосоми утворювали біваленти, частина з них залишалися неспареними (унівалентами), що позначено стрілками на Рис. 3.6А, Г. Повного синапсису хромосом у пахітенній стадії сперматоцитів цього самця виявлено не було, що може свідчити про порушення його фертильності.

3.4 Аналіз гаметогенезу у гібридів F1

Ми проаналізували гаметогенез у лабораторних F1-гібридів, отриманих від HD- (5 самців, 10 самиць) та ДН-схрещувань (6 самців, 10 самиць) (Таблиця 1). Серед 10 самиць від ДН-схрещувань, лише у 5 виявили як диплоїдні (Рис. 3.7Г), так і тетраплоїдні (Рис. 3.7Д) ооцити, тобто такі, що пройшли премейотичну ендореplikацію. Інші 5 мали ооцити лише з початковим диплоїдним рівнем плоїдності. Серед 10 самиць від HD-схрещувань, лише у двох були як диплоїдні (Рис. 3.7А), так і тетраплоїдні ооцити (Рис. 3.7Б), у решти – лише диплоїдні. Тетраплоїдні ооцити у HD і ДН мали 48 повноцінно спарених хромосом, що вказує на правильне формування бівалентів (Рис. 3.7Б, Д). В цілому, у гібридів отриманих шляхом штучних схрещувань спостерігалася подібна до природних гібридів картина (Рис. 3.6), тобто у деяких самиць частина ооцитів подвоювала геном, що забезпечувало подальшу можливість проходження мейозу.

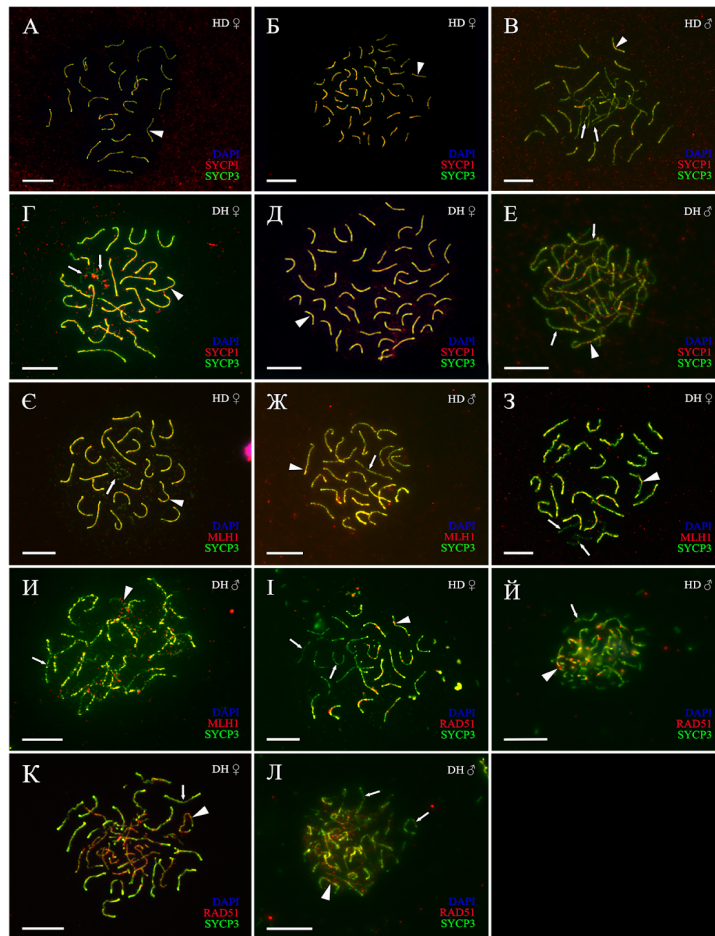


Рис. 3.7. Аналіз спарювання хромосом у пахітених ооцитах та сперматоцитах лабораторних гібридів F1. Синаптонемні комплекси були візуалізовані за допомогою білка SYCP3 (зелений, латеральний елемент) і білка SYCP1 (червоний, центральний елемент), біваленти позначено трикутниками, уніваленти – стрілками (А-Е); локуси рекомбінації ідентифіковані за допомогою антитіл до MLH1 (трикутники на Є-И); дволанцюгові розриви – за допомогою антитіл до Rad51 (позначено

трикутником на I-Л); хроматин пофарбовано DAPI (синій). Масштабна лінійка = 10 мкм.

У диплоїдних гібридних самців (HD і DH) клітин на стадії пахітени із подвоєним геномом не знайдено (Рис. 3.7В, Е). Кількість спарених хромосом у пахітенних сперматоцитах у лабораторних гібридних самців коливалася від 16 до 22 бівалентів. Це свідчить про неповний синапсис і дає підставу вважати гібридних самців стерильними. Локалізація Rad51 показала, що у клітинах без дуплікації сигнал від цього білка був інтенсивно виражений на унівалентах, але відсутній на бівалентах, що свідчить про порушення репарації дволанцюгових розривів ДНК (Рис. 3.6Й, Л). При чому як лабораторних, так і природних, оскільки у єдиного природного самця ми також спостерігали порушення спаровування хромосом (Рис. 3.6А, Г). Хоча інколи сперматоцити з аномальним спаровуванням все ж вступали в метафазу першого мейозу, можливо, самці не зовсім стерильні і їх фертильність знижена. Цю думку також підкріплюють результати порівняльної геномної гібридизації (CGH) та конфокальної мікроскопії.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ

У цьому дослідженні нами було комплексно проаналізовано цитогенетичні та мейотичні особливості батьківських видів *F. diaphanus* і *F. heteroclitus*, їхніх лабораторних і природних гібридів. За допомогою методів CGH, FISH-картування, імуофлуоресцентного фарбування та конфокальної мікроскопії вперше для риб роду *Fundulus* ми дослідили структуру хромосом, розподіл видоспецифічних повторів і перебіг гаметогенезу.

4.1 Структурна цілісність хромосом і локалізація видоспецифічних повторів у клональних гібридів

Отримані нами результати CGH свідчать про чітке розмежування батьківських хромосомних наборів у гібридів риб *Fundulus* і демонструють відсутність інтрогресій чи значних хромосомних перебудов у них. Відсутність рекомбінації та інтрогресій між батьківськими геномами також була показана шляхом геномної гібридизації *in situ* у інших клональних тварин: гібридогенетичних жаб роду *Pelophylax* [174, 175], риб роду *Hypseleotris* [173] та *Cobitis* [135]. Такі результати підтримують гіпотезу, що у клональних тварин не спостерігається значних хромосомних перебудов між гомологічними хромосомами батьківських видів, оскільки клональне розмноження ізолює геноми гібридних предків і запобігає їхній рекомбінації [39, 40].

Попри структурну цілісність хромосом батьківських видів в каріотипах гібридів, FISH-картування показало, що локалізація сателітних послідовностей SatFH42, SatFH56, SatFD95 та SatFD207 різниться між природніми та F1-гібридами. У природних гібридів виявлено відмінні патерни сигналів, зокрема колокалізацію сигналів SatFD95 та SatFH56, яка відсутня у лабораторних F1-гібридів і батьківських видів. Відмінності в структурі та складі геномів гібридних форм можуть пояснюватися двома основними причинами. Перша пов'язана із давністю формування

гібридних ліній. *F. diaphanus* та *F. heteroclitus* є несестринськими видами, які розійшлися приблизно 15-25 мільйонів років тому [13]. Відтак, гібриди, що виникли на основі цих таксонів, могли сформуватися ще на ранніх етапах їхньої еволюційної дивергенції. За тривалий час, що минув від моменту первинної гібридизації, геноми батьківських видів зазнали суттєвих змін, що призвело до розбіжностей у послідовностях сателітної ДНК і, відповідно, до різних патернів локалізації повторів у сучасних гібридів. У гібридів же можуть зберігатися фрагменти “законсервованих” геномів предкових форм, або їх ще називають “примарними геномами”, тобто такими, що передаються клонально через покоління. Такі гібриди можна розглядати як еволюційні “капсули часу”, що зберігають генетичні дані вже зниклих або трансформованих ліній [176]. Зокрема, нещодавнє дослідження гібридів *Cobitis sp.* показало, що вони зберігають у собі цілий гаплоїдний геном вимерлого виду. У деяких випадках відбувається втрата гетерозиготності, тобто переписування алелів у геномі існуючого виду на алелі вимерлого виду, ймовірно, внаслідок конверсії генів [177]. Це підтверджує, що навіть через сотні тисяч після формування гібридів певні геномні ділянки можуть залишатися стабільними. Другий механізм пов’язаний із явищем геномного шоку [178, 179]. Поєднання геномів віддалених видів порушує усталені епігенетичні механізми регуляції, активує транспозони та спричиняє перебудову повторюваних ділянок ДНК. Ці процеси є типовими проявами геномного шоку [178], який часто супроводжує гібридизацію і може зумовлювати відмінності у структурі сателітних повторів навіть у межах близьких за походженням гібридних ліній [178, 179]. Без рекомбінації клональні геноми накопичують мутації та структурні зміни незалежно, що відповідає так званому ефекту Мезельсона [180]. Цей ефект описує явище, коли гомологічні копії геному в межах однієї особини еволюціонують окремо, часто внаслідок порушення епігенетичних механізмів і активації транспозонів, а також розширення або скорочення сателітної ДНК після гібридизації [181]. Як наслідок, клональні

або напівклональні лінії можуть демонструвати суттєві відмінності у складі та організації геному порівняно з батьківськими видами. Певні паралелі можна провести з представниками ряду *Phasmatodea*, де гібридизація та подальше клональне розмноження супроводжуються значними каріотипними перебудовами і зміною локалізації сателітних повторів [182, 183]. У комплексах *Squalius alburnoides* та *Bacillus* (*Phasmatodea*) навіть точно ідентифікувати батьківські види часто неможливо [183, 149]. Це пов'язано з давністю гібридизаційних подій, подальшою еволюцією окремих ліній, а також із накопиченням мутацій унаслідок дії храповика Мюллера, характерного для клональних форм розмноження [184]. У таких системах спостерігаються несталі репродуктивні режими, що передбачають циклічну втрату, заміну або відновлення батьківських геномів, подібно до процесів, описаних для диплоїдних і триплоїдних самок *S. alburnoides* з південних популяцій [149]. Таким чином, відсутність рекомбінації у клональних ліній сприяє поступовій деградації та перебудові їхніх геномів, унаслідок чого формуються стабільні гібридні системи, здатні функціонувати незалежно від своїх предкових видів.

Отже, попри відсутність хромосомних перебудов і чітке розмежування батьківських геномів, клональні гібриди риб *Fundulus* демонструють виражену дивергенцію в кількості і локалізації центромерних повторів. Це ймовірно зумовлено давністю походження гібридних ліній, дією геномного шоку та ефектом храповика Мюллера, які сприяють поступовій модифікації повторюваних послідовностей і накопиченню відмінностей у структурі геномів без порушення їх загальної каріотипної стабільності.

4.2 Стерильність самців та фертильність самиць у природних гібридів

Дослідження процесів гаметогенезу за допомогою імунофлуоресцентного маркування пахітених хромосом, флуоресцентної

гібридизації *in situ* (FISH) та конфокальної мікроскопії виявило виражену статеву асиметрію серед гібридів. У гібридних самців відзначено суттєві порушення мейотичних процесів. У їхніх сім'яниках спостерігалися гоноцити, клітини на стадії пахітени та численні сперматоцити метафази I, однак подальші стадії сперматогенезу, зокрема формування сперматид, не реєструвалися. Крім того, у тканинах виявлено скупчення клітин з атиповим хроматином, що, ймовірно, свідчить про апоптичні процеси. На стадії пахітени виявлялися порушення кон'югації гомологічних хромосом, що проявлялося у неповному формуванні бівалентів, а також ознаки дефектної репарації дволанцюгових розривів ДНК. Аналіз веретена поділу показав, що у значної частини сперматоцитів метафази I спостерігалось неправильне вирівнювання бівалентів або утворення унівалентів, що, вірогідно, перешкоджало завершенню мейозу й призводило до накопичення клітин на цій стадії. Подібні порушення, імовірно, зумовлені геномною несумісністю батьківських видів, яка ускладнює синапсис і розходження гомологічних хромосом. Отримані дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень, які також вказують на виражену стерильність гібридних самців внаслідок порушення кон'югації хромосом у батьківських видів у родів *Clarias*, *Cobitis*, *Poecilia* [63, 122, 138, 185].

На відміну від самців, гібридні самиці залишалися фертильними, що підтверджувалося наявністю гоноцитів, а також кластерів клітин на стадії пахітени, розташованих між превітелогенними та вітелогенними ооцитами. Було виявлено два типи ооцитів, які відрізнялися плоїдністю та здатністю до парування: диплоїдні ооцити з початковим рівнем плоїдності та тетраплоїдні ооцити з подвоєною плоїдністю внаслідок премейотичної ендореплікації [115, 145]. Премейотична ендореплікація забезпечує кожній хромосомі можливість знайти гомологічну копію для синапсису і рекомбінації навіть за наявності гетерологічних сегментів у гібридному геномі. Як наслідок, такі клітини можуть утворювати стабільні біваленти, завершувати мейоз і продукувати нередуковані гамети, ідентичні

материнському геному. Премейотична ендореplikація геномів не є унікальним явищем і зустрічається в природних клональних лініях риб, амфібій та рептилій [62, 73, 74, 90, 115, 145, 173, 186], проте у гібридів роду *Fundulus* була доведена вперше. Своєю чергою, диплоїдні ооцити не здатні пройти через контрольну точку пахітени, яка забезпечує перевірку правильності спарювання гомологів, унаслідок чого ініціюється апоптоз. Подібні спостереження були зроблені й у представників інших таксонів: наприклад, у мейотичних клітинах з аномальним спарюванням хромосом у гібридів риб, амфібій та рептилій також виявляли зупинку мейозу на стадії пахітени та подальшу деградацію клітин [73, 75, 137, 187, 188]. Однак у досліджених нами риб ми спостерігаємо не завжди повні порушення пейрингу: іноді відбувається майже повне формування бівалентів. Ми не знаємо чи здатні диплоїдні ооцити пройти мейоз, проте такі випадки фіксуються в літературі. Життєздатне потомство отримували як із тетраплоїдних, так і з диплоїдних ооцитів гібридів, отриманих шляхом схрещування сомів *Clarias macrocephalus* та *C. gariepinus*, що свідчить про те, що диплоїдні ооцити необов'язково є нефункціональними [189, 190].

Хоча премейотична ендореplikація є поширеним вирішенням подолання стерильності серед клональних гібридів, вона – не єдиний існуючий механізм. Автоміксис – форма нестатевого розмноження, за якої диплоїдність яйцеклітини відновлюється шляхом злиття ооцита з полярним тільцем. Такий механізм зафіксований у деяких акул [191], коמודських варанів та змії [192], а також у рослин, комах, ракоподібних і тихоходок [193]. Апоміксис, своєю чергою, передбачає повне пригнічення мейозу з утворенням яйцеклітини шляхом мітозу, що забезпечує повне клональне успадкування без генетичної варіабельності. Цей механізм відомий зокрема у гіногенетичних риб *Poecilia formosa*, де апоміксис пов'язаний із порушеннями на ранніх етапах мейотичної профазі I. Це призводить до формування унівалентів та відсутності гомологічної рекомбінації хромосом, забезпечуючи відтворення генетично ідентичного потомства

[114, 122]. Наші результати свідчать, що у досліджуваних нами риб механізмом утворення клональних ооцитів є саме премейотична ендореплікація, що підтверджується наявністю ооцитів з подвоєною кількістю хромосом перед мейозом.

Ендореплікація може відбуватися трьома основними шляхами: 1) злиттям клітин, коли дві гоноцити об'єднуються; 2) ендомітозом, під час якого відбувається реплікація ДНК і конденсація хромосом, але мітоз або розходження хромосом не завершуються; 3) та ендоредуплікацією (або ендоциклінгом), що характеризується повторними циклами синтезу ДНК у фазі S без входження клітини в мітоз. Механізми ініціації ендореплікації досі вивчаються, проте існує кілька основних гіпотез щодо них. Дослідження геміклональних гібридів риб *Hypseleotris* показують, що ендореплікація може бути зумовлена ендомітозом - мітозом без сегрегації хромосом, що призводить до подвоєння геному ще до початку мейозу [194]. На основі робіт, присвячених стрес-індукованій поліплоїдизації в соматичних клітинах *Drosophila* [195], було висунуто припущення, що в гібридів деякі білки, залучені до шляху Cyclin/Cdk1-AurB, можуть транслюватися з геномів різних батьківських видів, утворюючи ферментні гетерокомплекси зі зниженою функціональністю порівняно з білками, які складаються з продуктів одного виду. Такі гетерокомплекси можуть зумовлювати зниження рівня кінази AurB, що, своєю чергою, сприяє початку ендореплікації або ендомітозу в окремих гоноцитах гібридних самок [137]. Крім того, існує гіпотеза, що стимулювати проліферацію клітин і запускати ендореплікацію можуть сигнальні шляхи, активовані апоптозом, такі як Wnt і Notch [137, 195, 196]. У ще одній роботі говориться, що премейотичне злиття зародкових клітин у гібридів може слугувати потужним тригером для ендореплікації, хоча її механізми потребують подальшого вивчення [197]. На підставі аналізу з використанням конфокальної мікроскопії двоядерних клітин у фундулюсів

не виявлено, що свідчить про те, що злиття зародкових клітин, ймовірно, не відбувається.

Дуплікація також може бути постмейотичною, тобто коли подвоєння геному відбувається після завершення мейозу, коли утворений гаплоїдний ооцит проходить ще один цикл реплікації ДНК без поділу ядра. У результаті формується гомозиготна диплоїдна клітина, здатна розпочати розвиток без запліднення, як це спостерігається, наприклад, у асексуальних ящірок роду *Aspidoscelis* [68]. Проте у нашому дослідженні у гібридів риб роду *Fundulus* наявні ознаки саме премейотичної дуплікації, оскільки подвоєння геному відбувається до початку мейозу, на стадії гоноцитів. Крім того, у клітинах не спостерігається гаплоїдних ядер чи мейотичних структур, що виключає можливість постмейотичної ендореплікації.

4.3 Гаметогенез у лабораторних гібридів F1

Подібно до результатів у природних гібридів, гаметогенез лабораторних особин демонструє виражену статеву асиметрію. У самців обох типів гібридів (HD та DH) спостерігаються значні порушення мейозу: формування унівалентів, неповний синапсис та відсутність сперматид. Така ситуація є типовим проявом класичної гібридної стерильності, що виникає внаслідок геномної несумісності між батьківськими формами. Гібридна стерильність зазвичай пов'язана з порушенням парування гомологічних хромосом під час мейозу, що призводить до асинапсису, не розходження хромосом та формування нефункціональних гамет [6, 51, 52].

Рівень цих порушень прямо залежить від ступеня генетичної дивергенції між батьківськими видами: чим більша відстань між ними, тим імовірніше виникнення стерильності. У близькоспоріднених видів гібриди можуть залишатися частково або повністю фертильними, оскільки їхні хромосоми все ще зберігають достатню гомологію для нормального кон'югаційного процесу. Натомість у більш віддалених комбінаціях мейоз часто зупиняється на ранніх стадіях, і гамети не формуються. Саме на межі

між фертильністю та повною стерильністю виникає клональність, коли замість редукційного мейозу реалізуються модифіковані або частково збережені мейотичні цикли, що забезпечують відтворення без рекомбінації [40, 115, 138]. Отже, досліджувані нами самці гібридів від лабораторних схрещувань були нефертильними, що узгоджується з попередніми даними гібридів F1 риб роду *Cobitis* [138], а також було зареєстровано в кількох природних гібридних комплексах серед інших таксонів [115, 137, 146].

У самиць гібридів виявлено два типи ооцитів: диплоїдні та тетраплоїдні. Імунофлуоресцентне забарвлення та FISH показали, що тетраплоїдні ооцити утворюються внаслідок премейотичної ендореплікації, тобто подвоєння набору хромосом перед мейозом. Це забезпечує повне спарювання гомологічних хромосом та нормальний кросинговер. Вперше для гібридів *Fundulus* показано, що утворення фертильних ооцитів можливе вже у першому поколінні. Подібні результати спостерігаються й у представників інших таксонів: у гібридів щиповок (*Cobitis*), медак (*Oryzias*) та сомів (*Clarias*) [138, 187, 190, 198].

Отже, у лабораторних F1 гібридних самиць роду *Fundulus* ми також зафіксували премейотичну ендореплікацію, яка дозволяє утворювати диплоїдні ооцити, здатні до подальшого розвитку. Гіпотетично, ці диплоїдні ооцити можуть запліднюватися, збільшуючи свою кількість хромосом до триплоїдного набору. Адже триплоїдні особини зустрічаються поміж диплоїдів і тетраплоїдів в інших природних клональних системах, наприклад, серед риб *Cobitis* та *Carassius*, або жаб *Pelophylax* тощо [7, 9, 48, 49, 61, 63, 64, 106, 138]. Та й поміж природних диплоїдних гібридів F1 роду *Fundulus*, що складають близько 10% угруповання, знаходили триплоїдних особин, але вони становили менше 1% [16, 17, 151, 161]. Тим не менш, нами не було виловлено триплоїдних особин і також ми не отримали їх шляхом штучних скрещувань. Аналіз FISH показав наявність лише давніх клональних ліній, що свідчить про кращу пристосованість природних клональних популяцій, тоді як потенційні триплоїдні зародки,

ймовірно, не виживають через геномну нестабільність або порушення мейозу.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз літературних джерел засвідчив, що гібридогенний комплекс *Fundulus* характеризується виразною статевою асиметрією фертильності: у більшості випадків самці є стерильними, тоді як самиці здатні до відтворення. Клональні гібриди відтворюються шляхом гіногенезу, що відповідає загальним уявленням про цей комплекс риб.

2. Картування видоспецифічних тандемних повторів SatFH42, SatFH56, характерних для *Fundulus heteroclitus*, а також SatFD95 і SatFD207, специфічних для *F. diaphanus*, на метафазних хромосомах батьківських видів, лабораторних F1 та природних клональних гібридів продемонструвало збереження загального розмежування батьківських геномів. Отримані дані узгоджуються з результатами CGH-аналізу та підтверджують відсутність суттєвих хромосомних перебудов чи ознак інтрогресії між геномами цих видів. Водночас зафіксовано відмінності у структурній організації й локалізації повторів у природних гібридних ліній. Ці відмінності можуть бути пов'язані з давністю походження клональних форм та перебігом геномних перебудов, що супроводжують гібридизацію еволюційно віддалених видів.

3. Аналіз цитогенетичних процесів у мейозі виявив статеву асиметрію у F1 та клональних гібридів. У самців встановлено порушення кон'югації хромосом на стадії пахітени, що призводить до формування бівалентів та унівлентів. Як наслідок, у подальших стадіях мейозу виникають порушення вирівнювання хромосом під час метафази I, що зрештою заважає формуватися сперматидам. У самиць виявлена премейотична ендореплікація, яка забезпечує подвоєння геномного набору перед мейозом і формування морфологічно стабільних бівалентів. Водночас цей процес охоплює не всі зародкові клітини: у частини з них ендореплікація не відбувається і такі клітини не проходять далі пахітени, за рахунок порушення кон'югації хромосом.

4. Морфологічний та мікроанатомічний аналіз гонад, виконаний із застосуванням конфокальної мікроскопії, підтвердив дані цитогенетичних досліджень. У гібридних самців виявлено зародкові клітини і сперматоцити, однак відсутні сформовані сперматозоїди в сім'яниках. При цьому у них підвищена частота апоптозу, що вказує на незавершений сперматогенез. У самиць виявлені зародкові клітини і диплотенні ооцити, що відповідають механізмам формування нередукованих гамет.

5. Порівняльний аналіз лабораторних F1 та природних клональних гібридів показав, що обидва типи здатні до розмноження завдяки премейотичній ендореplikації, проте природні лінії характеризуються більшою стабільністю цитогенетичних процесів та ефективнішим формуванням нередукованих гамет. Вони демонструють стале розмежування батьківських геномів та значну молекулярну дивергенцію тандемних повторів, що узгоджується з більшою давністю їх еволюційного формування та тривалою дією процесів гібридизації.

ПОДЯКИ

Висловлюю щирю подяку завідувачу Лабораторії неменделівського успадкування (Laboratory of Non-Mendelian Evolution) Інституту фізіології та генетики тварин у місті Лібехов (Чехія) Карелу Янко за наданий дозвіл на проходження стажування!

Щира подяка висловлюється Анні Дальзієль та Анні-Марії Діон-Коте за невтомну допомогу у зборі матеріалу, вилов риб та організацію штучних схрещувань, що стало ключовим етапом виконання дослідження.

Окрема подяка Пустоваловій Елеонорі за цінну методичну підтримку, детальне навчання сучасним цитогенетичним та молекулярним методам і постійну готовність консультувати у процесі роботи.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

Howard D. J. Reinforcement: Origin, Dynamics, and Fate of an Evolutionary Hypothesis. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. 1993. P. 46–69. URL: <https://doi.org/10.1093/oso/9780195069174.003.0003>

Servedio M. R., Noor M. A. F. The Role of Reinforcement in Speciation: Theory and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2003. Vol. 34, no. 1. P. 339–364. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132412>

Mallet J. Hybrid speciation. *Nature*. 2007. Vol. 446, no. 7133. P. 279–283. URL: <https://doi.org/10.1038/nature05706>

Abbott R. J. et al. Homoploid hybrid speciation in action. *TAXON*. 2010. Vol. 59, no. 5. P. 1375–1386. URL: <https://doi.org/10.1002/tax.595005>

Abbott R. J. et al. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 2013. Vol. 26, no. 2. P. 229–246. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>

McKee B. D. Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 2004. Vol. 1677, no. 1-3. P. 165–180. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.11.017>

Bickham J. W. et al. Ploidy Diversity and the Production of Balanced Gametes in Male Twist-Necked Turtles (*Platemys platycephala*). *Copeia*. 1993. Vol. 1993, no. 3. P. 723. URL: <https://doi.org/10.2307/1447233>

Schön, I., Martens, K., & van Dijk, P. (2009). Lost sex. The evolutionary biology of parthenogenesis, 1-615

Christiansen D. G., Reyer H.-U. From Clonal To Sexual Hybrids: Genetic Recombination Via Triploids In All-Hybrid Populations Of Water Frogs. *Evolution*. 2009. Vol. 63, no. 7. P. 1754–1768. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00673.x>

Oziolor E. M. et al. Adaptive introgression enables evolutionary rescue from extreme environmental pollution. *Science*. 2019. Vol. 364, no. 6439. P. 455–457. URL: <https://doi.org/10.1126/science.aav4155>

Burnett K. G. et al. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2007. Vol. 2, no. 4. P. 257–286. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.09.001>

Whitehead A. The Evolutionary Radiation Of Diverse Osmotolerant Physiologies In Killifish (*Fundulus* sp.). *Evolution*. 2010. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00957.x>

Ghedotti M. J., Davis M. P. The taxonomic placement of three fossil *Fundulus* species and the timing of divergence within the North American topminnows (Teleostei: *Fundulidae*). *Zootaxa*. 2017. Vol. 4250, no. 6. P. 577. URL: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4250.6.5>

Fritz E. S., Garside E. T. Salinity preferences of *Fundulus heteroclitus* and *F. diaphanus* (Pisces: *Cyprinodontidae*): their role in geographic distribution. *Canadian Journal of Zoology*. 1974. Vol. 52, no. 8. P. 997–1003. URL: <https://doi.org/10.1139/z74-133>

Griffith, R. W. (1972). *Studies on the physiology and evolution of killifishes of the genus Fundulus*. (Ph.D. Thesis). New Haven, CT: Yale University.

Hernández Chávez C., Turgeon J. Asexual and sexual hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* in the Canadian Atlantic region. *Molecular Ecology*. 2007. Vol. 16, no. 7. P. 1467–1480. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03239.x>

Dawley R. M. Clonal hybrids of the common laboratory fish *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. Vol. 89, no. 6. P. 2485–2488. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2485>

Amunugama R., Fishel R. Homologous Recombination in Eukaryotes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012. P. 155–206. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387665-2.00007-9>

Zhang J. et al. Meiosis completion and various sperm responses lead to unisexual and sexual reproduction modes in one clone of polyploid *Carassius gibelio*. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep10898>

Heyer W.-D., Ehmsen K. T., Liu J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 2010. Vol. 44, no. 1. P. 113–139. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>

Imai Y. et al. Meiotic Chromosome Dynamics in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.757445>

Mercier R. et al. The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2015. Vol. 66, no. 1. P. 297–327. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035923>

Mercier R. et al. The Recombinases DMC1 and RAD51 Are Functionally and Spatially Separated during Meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2012. Vol. 24, no. 5. P. 2058–2070. URL: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098459>.

Orr-Weaver T. L., Szostak J. W. Fungal recombination. *Microbiological Reviews*. 1985. Vol. 49, no. 1. P. 33–58. URL: <https://doi.org/10.1128/mnbr.49.1.33-58.1985>

Lenormand T. et al. Evolutionary mysteries in meiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. Vol. 371, no. 1706. P. 20160001. URL: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0001>

Mather K. Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. *Journal of Genetics*. 1935. Vol. 30, no. 1. P. 53–78. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02982205>

Цитологія, загальна гістологія та ембріологія: Практикум: Навч. посібник/ В.К. Напханюк, В.А. Кузьменко, С.П. Заярна,

О.А. Ульянцева; За ред. В.К. Напханюка. – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. – (Б-ка студента-медика).

Smith, J. M. The evolution of sex. Cambridge [Eng.] : Cambridge University Press, 1978. 222 p.

Schön, I., Martens, K., & van Dijk, P. (2009). Lost sex. The evolutionary biology of parthenogenesis, 1-615.

Sawada H., Inoue N., Iwano M. Sexual Reproduction in Animals and Plants. Springer, 2014. 492 p.

Burt A. Perspective: Sex, Recombination, And The Efficacy Of Selection—Was Weismann Right? *Evolution*. 2000. Vol. 54, no. 2. P. 337. URL: [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2000\)054\[0337:psrate\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2000)054[0337:psrate]2.0.co;2)

Fisher, R. A. (1930). The Natural Selection.

Muller H. J. Some Genetic Aspects of Sex. *The American Naturalist*. 1932. Vol. 66, no. 703. P. 118–138. URL: <https://doi.org/10.1086/280418>

Darlington C. D. Misdivision and the genetics of the centromere. *Journal of Genetics*. 1939. Vol. 37, no. 2. P. 341–364. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02982733>

Grant, V. (1975). *Genetics of flowering plants*. Columbia University Press.

de Meeûs T., Prugnotte F., Agnew P. Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007. Vol. 64, no. 11. P. 1355–1372. URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6515-2>

Учасники проектів Вікімедіа. Безстатеве розмноження – Вікіпедія. *Вікіпедія*.

URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Безстатеве_розмноження (дата звернення: 07.11.2025).

Bogart J. P., Dawley R. M. Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates (Bulletin / New York State Museum,). New York State Museum, 1989. 302 p.

Neaves W. B., Baumann P. Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics*. 2011. Vol. 27, no. 3. P. 81–88. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.002>

Stöck M. et al. Sex chromosomes in meiotic, hemiclinal, clonal and polyploid hybrid vertebrates: along the 'extended speciation continuum'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2021. Vol. 376, no. 1833. P. 20200103. URL: <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0103>

Smith, J. M., & Maynard-Smith, J. (1978). *The evolution of sex (Vol. 4)*. Cambridge: Cambridge University Press.

Hamilton W. D. Sex versus Non-Sex versus Parasite. *Oikos*. 1980. Vol. 35, no. 2. P. 282. URL: <https://doi.org/10.2307/3544435>

Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1–30.

Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. Cambridge: Cambridge University Press

Kočí J. et al. No evidence for accumulation of deleterious mutations and fitness degradation in clonal fish hybrids: Abandoning sex without regrets. *Molecular Ecology*. 2020. Vol. 29, no. 16. P. 3038–3055. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.15539>

Joly P. The future of the selfish hemiclone: A Neodarwinian approach to water frog evolution. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe*. 2001. Vol. 77, no. 1. P. 31–38. URL: <https://doi.org/10.1002/mmnz.4850770106>

Som C., Bagheri H. C., Reyer H.-U. Mutation accumulation and fitness effects in hybridogenetic populations: a comparison to sexual and asexual systems. *BMC Evolutionary Biology*. 2007. Vol. 7, no. 1. P. 80. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-80>

Yamauchi A. et al. Triploid Bridge and Role of Parthenogenesis in the Evolution of Autopolyploidy. *The American Naturalist*. 2004. Vol. 164, no. 1. P. 101–112. URL: <https://doi.org/10.1086/421356>

Husband B. C. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2004. Vol. 82, no. 4. P. 537–546. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00339.x>.

van Riemsdijk, I. (2019). Hybrid zone dynamics in amphibians.

Arnold M. L., Hodges S. A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents?. *Trends in Ecology & Evolution*. 1995. Vol. 10, no. 2. P. 67–71. URL: [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(00\)88979-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(00)88979-x)

Rieseberg L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001. Vol. 16, no. 7. P. 351–358. URL: [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02187-5](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02187-5)

Rhymer J. M., Simberloff D. Extinction By Hybridization And Introgression. Annual Review Of Ecology And Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1996. Vol. 27, no. 1. P. 83–109. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>

Dowling T. E., Secor a. C. L. The Role Of Hybridization And Introgression In The Diversification Of Animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1997. Vol. 28, no. 1. P. 593–619. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.593>

Cockayne L., Allan H. H. The Naming of Wild Hybrid Swarms. *Nature*. 1926. Vol. 118, no. 2974. P. 623–624. URL: <https://doi.org/10.1038/118623a0>

Perry W. L. et al. Hybrid Zone Dynamics And Species Replacement Between *Orconectes* Crayfishes In A Northern Wisconsin Lake. *Evolution*. 2001. Vol. 55, no. 6. P. 1153–1166. URL: <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00635.x>

Walters D. M. et al. Red shiner invasion and hybridization with blacktail shiner in the upper Coosa River, USA. *Biological Invasions*. 2007. Vol. 10, no. 8. P. 1229–1242. URL: <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9198-6>

Echelle A. A., Connor P. J. Rapid, Geographically Extensive Genetic Introgression After Secondary Contact Between Two Pupfish Species (*Cyprinodon*, *Cyprinodontidae*). *Evolution*. 1989. Vol. 43, no. 4. P. 717–727. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb05171.x>

Wood T. E. et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants / *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, no. 33. P. 13875–13879. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0811575106>

Morgan C. et al. Derived alleles of two axis proteins affect meiotic traits in autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. Vol. 117, no. 16. P. 8980–8988. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1919459117>

Borkin, L.J. in Patterns of Distribution of Amphibians (ed. Duellman, W.E.) 329–420 (J. Hopkins Univ. Press, Baltimore, 1999).

Stöck M. et al. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature Genetics*. 2002. Vol. 30, no. 3. P. 325–328. URL: <https://doi.org/10.1038/ng839>

Dedukh D. et al. A cyclical switch of gametogenic pathways in hybrids depends on the ploidy level. *Communications Biology*. 2024. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05948-6>

Stöck M. et al. A cryptic heterogametic transition revealed by sex-linked DNA markers in Palearctic green toads. *Journal of Evolutionary Biology*. 2011. Vol. 24, no. 5. P. 1064–1070. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02239.x>

Liegeois M., Sartori M., Schwander T. Extremely Widespread Parthenogenesis and a Trade-Off Between Alternative Forms of

Reproduction in Mayflies (Ephemeroptera). *Journal of Heredity*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1093/jhered/esaa027>

Lampert K. P. Facultative Parthenogenesis in Vertebrates: Reproductive Error or Chance?. *Sexual Development*. 2008. Vol. 2, no. 6. P. 290–301. URL: <https://doi.org/10.1159/000195678>

Ramachandran R., McDaniel C. D. Parthenogenesis in birds: a review. *Reproduction*. 2018. Vol. 155, no. 6. P. R245–R257. URL: <https://doi.org/10.1530/rep-17-0728>

Ho D. V. et al. Post-meiotic mechanism of facultative parthenogenesis in gonochoristic whiptail lizard species. *eLife*. 2024. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.7554/elife.97035>

Fields A. T. et al. Facultative parthenogenesis in a critically endangered wild vertebrate. *Current Biology*. 2015. Vol. 25, no. 11. P. R446–R447. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.018>

Kratochvíl L. et al. Mixed-sex offspring produced via cryptic parthenogenesis in a lizard. *Molecular Ecology*. 2020. Vol. 29, no. 21. P. 4118–4127. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.15617>

Fujita M. K. et al. Evolutionary Dynamics and Consequences of Parthenogenesis in Vertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2020. Vol. 51, no. 1. P. 191–214. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011720-114900>

Lutes A. A. et al. Sister chromosome pairing maintains heterozygosity in parthenogenetic lizards. *Nature*. 2010. Vol. 464, no. 7286. P. 283–286. URL: <https://doi.org/10.1038/nature08818>

Dedukh D. et al. Premeiotic endoreplication is essential for obligate parthenogenesis in geckos. *Development*. 2022. Vol. 149, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1242/dev.200345>

Dedukh D. et al. Premeiotic endoreplication is the mechanism of obligate parthenogenesis in rock lizards of the genus *Darevskia*. *Biology Letters*. 2024. Vol. 20, no. 9. URL: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2024.0182>

Newton A. A. et al. Widespread failure to complete meiosis does not impair fecundity in parthenogenetic whiptail lizards. *Development*. 2016. Vol. 143, no. 23. P. 4486–4494. URL: <https://doi.org/10.1242/dev.141283>

Röll B., von Düring M. U. G. Sexual characteristics and spermatogenesis in males of the parthenogenetic gecko *Lepidodactylus lugubris* (Reptilia, Gekkonidae). *Zoology*. 2008. Vol. 111, no. 5. P. 385–400. URL: <https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.09.004>

McKone M. J., Halpern S. L. The Evolution of Androgenesis. *The American Naturalist*. 2003. Vol. 161, no. 4. P. 641–656. URL: <https://doi.org/10.1086/368291>

Komen H., Thorgaard G. H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*. 2007. Vol. 269, no. 1-4. P. 150–173. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.009>

Pigneur L.-M. et al. Androgenesis: a review through the study of the selfish shellfish *Corbicula spp.* / *Heredity*. 2012. Vol. 108, no. 6. P. 581–591. URL: <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.3>

Schwander T., Oldroyd B. P. Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. Vol. 371, no. 1706. P. 20150534. URL: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0534>

Komaru A., Kawagishi T., Konishi K. Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution*. 1998. Vol. 208, no. 1. P. 46–50. URL: <https://doi.org/10.1007/s004270050152>

Nava J. L. R. et al. Molecular evidence for the natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* seed trees. *Heredity*. 2009. Vol. 104, no. 2. P. 185–190. URL: <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.112>

Pichot C. et al. Cypress Surrogate Mother Produces Haploid Progeny From Alien Pollen. *Genetics*. 2008. Vol. 178, no. 1. P. 379–383. URL: <https://doi.org/10.1534/genetics.107.080572>

Lavanchy G. et al. Evolution of alternative reproductive systems in *Bacillus* stick insects. *Evolution*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1093/evolut/qpae045>

Etoundi E. et al. Transition from sexuality to androgenesis through a meiotic modification during spermatogenesis in freshwater *Corbicula* clams. *PLOS ONE*. 2024. Vol. 19, no. 11. P. e0313753. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313753>

Mantovani B., scali V. Hybridogenesis and Androgenesis in the Stick-Insect *Bacillus rossius-Grandii benazzii* (Insecta, Phasmatodea). *Evolution*. 1992. Vol. 46, no. 3. P. 783. URL: <https://doi.org/10.2307/2409646>

Grunina A. S. et al. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. *International Journal of Refrigeration*. 2006. Vol. 29, no. 3. P. 379–386. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.07.009>

Parsons J. E., Thorgaard G. H. Production of androgenetic diploid rainbow trout. *Journal of Heredity*. 1985. Vol. 76, no. 3. P. 177–181. URL: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110060>

Wang M., van Bergen S., Van Duijn B. Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding. *Plant Physiology*. 2000. Vol. 124, no. 2. P. 523–530. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.523>

Macgregor H. C., Uzzell T. M. Gynogenesis in Salamanders Related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science*. 1964. Vol. 143, no. 3610. P. 1043–1045. URL: <https://doi.org/10.1126/science.143.3610.1043>

Bogart J. P. et al. Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome*. 2007. Vol. 50, no. 2. P. 119–136. URL: <https://doi.org/10.1139/g06-152>

Bi K., Bogart J. P. Time and time again: unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) are the oldest unisexual vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*. 2010. Vol. 10, no. 1. P. 238. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-238>

Bogart J. P., Dawley R. M. Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates (Bulletin / New York State Museum,). New York State Museum, 1989. 302 p.

Avise J. C. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112, no. 29. P. 8867–8873. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1501820112>

Cimino M. C. Egg-Production, Polyploidization and Evolution in a Diploid All-Female Fish of the Genus *Poeciliopsis*. *Evolution*. 1972. Vol. 26, no. 2. P. 294. URL: <https://doi.org/10.2307/2407039>

Schultz R. J. Hybridization, Unisexuality, and Polyploidy in the Teleost *Poeciliopsis* (*Poeciliidae*) and Other Vertebrates. *The American Naturalist*. 1969. Vol. 103, no. 934. P. 605–619. URL: <https://doi.org/10.1086/282629>

Schmidt D. J. et al. Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris*: *Eleotridae*). *Molecular Ecology*. 2011. Vol. 20, no. 16. P. 3367–3380. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2011.05206.x>

Dedukh D. et al. Programmed DNA elimination occurs during early gametogenesis in hybridogenetic hybrids from *Hexagrammos* genus. *Biology of Reproduction*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf125>

Graf, J. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* 289–301 (1989)

Lavanchy G., Schwander T. Hybridogenesis. *Current Biology*. 2019. Vol. 29, no. 1. P. R9–R11. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.046>

Chmielewska M. et al. Genome elimination from the germline cells in diploid and triploid male water frogs *Pelophylax esculentus*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1008506>

Bartmańska J., Ogielska M. Development of testes and differentiation of germ cells in water frogs of the *Rana esculenta* - complex (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*. 1999. Vol. 20, no. 3. P. 251–263. URL: <https://doi.org/10.1163/156853899x00286>

Dedukh D. et al. Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in R-E systems: results from artificial crossings experiments. *BMC Evolutionary Biology*. 2017. Vol. 17, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1063-3>

Dufresnes C. et al. Piecing the barcoding puzzle of Palearctic water frogs (*Pelophylax*) sheds light on amphibian biogeography and global invasions. *Global Change Biology*. 2024. Vol. 30, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1111/gcb.17180>

Biriuk O. V. et al. Gamete production patterns and mating systems in water frogs of the hybridogenetic *Pelophylax esculentus* complex in north-eastern Ukraine. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2016. Vol. 54, no. 3. P. 215–225. URL: <https://doi.org/10.1111/jzs.12132>

Stöck M. et al. Simultaneous Mendelian and clonal genome transmission in a sexually reproducing, all-triploid vertebrate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011. Vol. 279, no. 1732. P. 1293–1299. URL: <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1738>

Kim, I. & Lee, J. Diploid-triploid complex of the spined loach *Cobitis sinensis* and *C. longicarpus* (Pisces, Cobitidae). *Korean J. Ichthyol.* 2, 203–210 (1990).

Saitoh K., Kim I.-S., Lee E.-H. Mitochondrial Gene Introgression between Spined Loaches via Hybridogenesis†. *Zoological Science*. 2004. Vol. 21, no. 7. P. 795–798. URL: <https://doi.org/10.2108/zsj.21.795>

Alves M. J., Coelho M. M., Collares-Pereira M. J. Diversity in the Reproductive Modes of Females of the *Rutilus alburnoides* Complex (Teleostei, *Cyprinidae*): A Way to Avoid the Genetic Constraints of Uniparentalism. *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15, no. 10. P. 1233–1242. URL: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025852>

Morishima K., Yoshikawa H., Arai K. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity*. 2008. Vol. 100, no. 6. P. 581–586. URL: <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.17>

Zhang Q., Arai K., Yamashita M. Cytogenetic mechanisms for triploid and haploid egg formation in the triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *The Journal of Experimental Zoology*. 1998. Vol. 281, no. 6. P. 608–619. URL: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19980815\)281:6%3C608::aid-jez9%3E3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19980815)281:6%3C608::aid-jez9%3E3.0.co;2-r)

Carmona J. A. et al. Hybridogenetic Reproduction and Maternal Ancestry of Polyploid Iberian Fish: The *Tropidophoxinellus alburnoides* Complex. *Genetics*. 1997. Vol. 146, no. 3. P. 983–993. URL: <https://doi.org/10.1093/genetics/146.3.983>

Hubbs C. L., Hubbs L. C. Apparent Parthenogenesis In Nature, In A Form Of Fish Of Hybrid Origin. *Science*. 1932. Vol. 76, no. 1983. P. 628–630. URL: <https://doi.org/10.1126/science.76.1983.628>

Monaco P. J., Rasch E. M., Balsano J. S. Apomictic Reproduction in the Amazon Molly, *Poecilia formosa*, and Its Triploid Hybrids. *Evolutionary Genetics of Fishes*. Boston, MA, 1984. P. 311–328. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4652-4_6

Dedukh D. et al. Parthenogenesis as a Solution to Hybrid Sterility: The Mechanistic Basis of Meiotic Distortions in Clonal and Sterile Hybrids.

- Genetics*. 2020. Vol. 215, no. 4. P. 975–987.
URL: <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302988>
- Manan H. et al. A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals. *Aquaculture and Fisheries*. 2020.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.11.006>
- Fuad M. M. H., Vetešník L., Šimková A. Is gynogenetic reproduction in gibel carp (*Carassius gibelio*) a major trait responsible for invasiveness?. *Journal of Vertebrate Biology*. 2021. Vol. 70, no. 4.
URL: <https://doi.org/10.25225/jvb.21049>
- Liu Q. et al. The Research Advances in Distant Hybridization and Gynogenesis in Fish. *Reviews in Aquaculture*. 2024.
URL: <https://doi.org/10.1111/raq.12972>
- Schlupp I. The Evolutionary Ecology of Gynogenesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2005. Vol. 36, no. 1. P. 399–417.
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152629>
- Yamashita M. et al. Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: Direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Developmental Biology*. 1990. Vol. 137, no. 1. P. 155–160.
URL: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90016-c](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90016-c)
- Lampert K. P., Schartl M. The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008. Vol. 363, no. 1505. P. 2901–2909.
URL: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0040>
- Dedukh D. et al. Achiasmatic meiosis in the unisexual Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Chromosome Research*. 2022.
URL: <https://doi.org/10.1007/s10577-022-09708-2>
- Warren W. C. et al. Clonal polymorphism and high heterozygosity in the celibate genome of the Amazon molly / *Nature Ecology & Evolution*.

2018. Vol. 2, no. 4. P. 669–679.
URL: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0473-y>
- Stöck M. et al. Monophyletic origin of multiple clonal lineages in an asexual fish (*Poecilia formosa*). *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19, no. 23. P. 5204–5215. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04869.x>
- Monaco P. J., Rasch E. M., Balsano J. S. Nucleoprotein cytochemistry during oogenesis in a unisexual fish, *Poecilia formosa*. *The Histochemical Journal*. 1981. Vol. 13, no. 5. P. 747–761.
URL: <https://doi.org/10.1007/bf01003287>
- Rasch E. M., Monaco P. J., Balsano J. S. Cytophotometric and autoradiographic evidence for functional apomixis in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa* and its related, triploid unisexuals. *Histochemistry*. 1982. Vol. 73, no. 4. P. 515–533. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00493366>
- Gu Q. et al. Phylogeographic relationships and the evolutionary history of the *Carassius auratus* complex with a newly born homodiploid raw fish (2nNCRC). *BMC Genomics*. 2022. Vol. 23, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08468-x>
- Yamashita M. et al. A Tripolar Spindle Formed at Meiosis I Assures the Retention of the Original Ploidy in the Gynogenetic Triploid Crucian Carp, Ginbuna *Carassius auratus langsdorfii*. (fish oocytes/gynogenesis/meiosis/spindle formation/histone H1 kinase). *Development, Growth and Differentiation*. 1993. Vol. 35, no. 6. P. 631–636. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.1993.00631.x>
- Kobayasi H. A cytological study on the maturation division in the oogenic process of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Japanese Journal of Ichthyology* 22.4 (1976): 234-240.
- Lu M. et al. Changes in ploidy drive reproduction transition and genomic diversity in a polyploid fish complex. *Molecular Biology and Evolution*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msac188>

Zhang F., Oshiro T., Takashima F. Chromosome synapsis and recombination during meiotic division in gynogenetic triploid gibel carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Japanese Journal of Ichthyology*. 1992. Vol. 39, no. 2. P. 151–155. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02905998>

Wang, Z. W., Zhu, H. P., Wang, D., Jiang, F. F., Guo, W., Zhou, L., & Gui, J. F. (2011). A novel nucleo-cytoplasmic hybrid clone formed via androgenesis in polyploid gibel carp. *BMC Research Notes*, 4(1), 82.

Bohlen J., Rab P. Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: *Cobitidae*), with a checklist of European forms and suggestions for conservation. *Journal of Fish Biology*. 2001. Vol. 59, no. 1. P. 75–89. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01380.x>

Janko K. et al. Hybrid asexuality as a primary postzygotic barrier between nascent species: On the interconnection between asexuality, hybridization and speciation. *Molecular Ecology*. 2017. Vol. 27, no. 1. P. 248–263. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.14377>

Majtánová Z. et al. Asexual Reproduction Does Not Apparently Increase the Rate of Chromosomal Evolution: Karyotype Stability in Diploid and Triploid Clonal Hybrid Fish (*Cobitis*, Cypriniformes, Teleostei). *PLOS ONE*. 2016. Vol. 11, no. 1. P. e0146872. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146872>

Janko K. et al. Dynamic Formation of Asexual Diploid and Polyploid Lineages: Multilocus Analysis of *Cobitis* Reveals the Mechanisms Maintaining the Diversity of Clones. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, no. 9. P. e45384. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045384>

Dedukh D., Marta A., Janko K. Challenges and Costs of Asexuality: Variation in Premeiotic Genome Duplication in Gynogenetic Hybrids from *Cobitis taenia* Complex. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 22. P. 12117. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms222212117>

Marta A. et al. Genetic and karyotype divergence between parents affect clonality and sterility in hybrids. *eLife*. 2023. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.7554/elife.88366.3>

Janko K. et al. Ice age cloning - comparison of the Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of spiny loaches (*Cobitis*; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*. 2005. Vol. 14, no. 10. P. 2991–3004. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02583.x>

Ko, M. H. Reproductive mechanisms of the unisexual diploid-triploid hybrid complex between the spined loach. *Cobitis hankugensis* (2009).

Arai K. Correction: Meiosis and gametogenesis in hybrid, polyploid, and clonal fishes: case studies in the dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fisheries Science*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/s12562-023-01716-3>

Morishima K. et al. A Cryptic Clonal Line of the Loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: *Cobitidae*) Evidenced by Induced Gynogenesis, Interspecific Hybridization, Microsatellite Genotyping and Multilocus DNA Fingerprinting. *Zoological Science*. 2002. Vol. 19, no. 5. P. 565–575. URL: <https://doi.org/10.2108/zsj.19.565>

Yamada A. et al. Hybrid origin of gynogenetic clones and the introgression of their mitochondrial genome into sexual diploids through meiotic hybridogenesis in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 2015. Vol. 323, no. 9. P. 593–606. URL: <https://doi.org/10.1002/jez.1950>

Arai K., Inamori Y. Viable hyperdiploid progeny between diploid female and induced triploid male in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture Science* 47.4 (1999): 489-495.

Kuroda M. et al. Clonal reproduction assured by sister chromosome pairing in dojo loach, a teleost fish. *Chromosome Research*. 2018. Vol. 26, no. 4. P. 243–253. URL: <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9581-4>

Itono M. et al. Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2006. Vol. 305A, no. 6. P. 513–523.
URL: <https://doi.org/10.1002/jez.a.283>

Cunha C. et al. The evolutionary history of the allopolyploid *Squalius alburnoides* (Cyprinidae) complex in the northern Iberian Peninsula. *Heredity*. 2010. Vol. 106, no. 1. P. 100–112.
URL: <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.70>

Alves M. J. et al. The genetics of maintenance of an all-male lineage in the *Squalius alburnoides* complex. *Journal of Fish Biology*. 2002. Vol. 60, no. 3. P. 649–662.

Alves M. J., Coelho M. M., Collares-Pereira M. J. *Genetica*. 2001. Vol. 111, no. 1/3. P. 375–385.
URL: <https://doi.org/10.1023/a:1013783029921>

Alves M. J. et al. Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2004. Vol. 301A, no. 7. P. 552–558. URL: <https://doi.org/10.1002/jez.a.51>

Dawley R. M., Schultz R. J., Goddard K. A. Clonal Reproduction and Polyploidy in Unisexual Hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces; Cyprinidae). *Copeia*. 1987. Vol. 1987, no. 2. P. 275.
URL: <https://doi.org/10.2307/1445762>

Goddard K. A., Dawley R. M. Clonal Inheritance of a Diploid Nuclear Genome by a Hybrid Freshwater Minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). *Evolution*. 1990. Vol. 44, no. 4. P. 1052.
URL: <https://doi.org/10.2307/2409566>

Goddard K. A., Schultz R. J. Aclonal Reproduction by Polyploid Members of the Clonal Hybrid Species *Phoxinus eos-neogaeus*

(Cyprinidae). *Copeia*. 1993. Vol. 1993, no. 3. P. 650.
URL: <https://doi.org/10.2307/1447226>

Lafond J., Angers B. Maternal ploidy shapes reproductive pathways in the triploid hybrid *Chrosomus eos* × *eos-neogaeus*. *Molecular Ecology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.17264>

Crossman E. J., Scott W. B. Freshwater Fishes of Canada. Gordon Soules Book Pub, 1985. 966 p.

Schaefer J., Duvernell D., Campbell D. C. Hybridization and introgression in two ecologically dissimilar *Fundulus* hybrid zones. *Evolution*. 2016. Vol. 70, no. 5. P. 1051–1063.
URL: <https://doi.org/10.1111/evo.12920>

Barbas R. E., Gilg M. R. Quantification of Reproductive Isolating Barriers Between Two Naturally Hybridizing Killifish Species. *Evolutionary Biology*. 2018. Vol. 45, no. 4. P. 425–436.
URL: <https://doi.org/10.1007/s11692-018-9460-0>

Fritz E. S., Garside E. T. Identification and description of hybrids of *Fundulus heteroclitus* and *F. diaphanus* (Pisces: Cyprinodontidae) from Porters Lake, Nova Scotia, with evidence for absence of backcrossing. *Canadian Journal of Zoology*. 1974. Vol. 52, no. 12. P. 1433–1442. URL: <https://doi.org/10.1139/z74-184>

Hubbs, C. L., Walker, B. W., & Johnson, R. E. *Hybridization in nature between species of American cyprinodont fishes. Contribution from the Laboratory of Vertebrate Biology of the University of Michigan*. 1943. 23, 1–21.

Weed A. C. Fishes from Southern Wisconsin. *Copeia*. 1921. No. 99. P. 69. URL: <https://doi.org/10.2307/1436983>

Mérette D., Bourret A., Turgeon J. Diversity and distribution of gynogenetic hybrids between *Fundulus diaphanus* and *Fundulus heteroclitus* in Porter's Lake (Nova Scotia) in relation to salinity. *Journal of Fish Biology*.

2009. Vol. 75, no. 5. P. 1115–1122.
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02396.x>

Dalziel A. C. et al. Using asexual vertebrates to study genome evolution and animal physiology: Banded (*Fundulus diaphanus*) x Common Killifish (*F. heteroclitus*) hybrid lineages as a model system. *Evolutionary Applications*. 2020. Vol. 13, no. 6. P. 1214–1239.
URL: <https://doi.org/10.1111/eva.12975>

Dawley R. M., Chrzanowski, D., Phiel, K. L., Beaulieu, K., & Goddard, K. A. Allozyme analysis of clonal diversity among unisexual hybrids of the killifishes *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus*. *Journal of Heredity*. 1999. Vol. 90, no. 6. P. 607–612.
URL: <https://doi.org/10.1093/jhered/90.6.607>

Moens P. B. Zebrafish: chiasmata and interference. *Genome*. 2006. Vol. 49, no. 3. P. 205–208. URL: <https://doi.org/10.1139/g06-021>

Araya-Jaime C. et al. Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. *Molecular Cytogenetics*. 2015. Vol. 8, no. 1. P. 4.
URL: <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0108-9>

Ozaki Y. et al. Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expression Patterns*. 2011. Vol. 11, no. 5-6. P. 309–315.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.03.002>

Saito K. et al. Telomere distribution pattern and synapsis initiation during spermatogenesis in zebrafish. *Developmental Dynamics*. 2014. Vol. 243, no. 11. P. 1448–1456. URL: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24166>

Blokhina Y. P. et al. The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. *PLOS Genetics*. 2019. Vol. 15, no. 1. P. e1007730. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007730>

Novák P. et al. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Research*. 2017. Vol. 45, no. 12. P. e111-e111. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx257>

Marta A. et al. Cytogenetic Characterization of Seven Novel satDNA Markers in Two Species of Spined Loaches (*Cobitis*) and Their Clonal Hybrids. *Genes*. 2020. Vol. 11, no. 6. P. 617. URL: <https://doi.org/10.3390/genes11060617>

Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., Nagahama Y. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of Development*. 2002. Vol. 111, no. 1-2. P. 167–171. URL: [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00613-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00613-x)

Begum S. et al. Germ cell markers in fishes - A review. *Aquaculture and Fisheries*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.03.015>

Majtánová Z. et al. Uniparental Genome Elimination in Australian Carp Gudgeons. *Genome Biology and Evolution*. 2021. Vol. 13, no. 6. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evab030>

Zaleśna A. et al. Evidence for Integrity of Parental Genomes in the Diploid Hybridogenetic Water Frog *Pelophylax esculentus* by Genomic in situ Hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*. 2011. Vol. 134, no. 3. P. 206–212. URL: <https://doi.org/10.1159/000327716>

Dudzik A. et al. Cytogenetics of the hybridogenetic frog *Pelophylax grafi* and its parental species *Pelophylax perezi*. *Genome Biology and Evolution*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evad215>

Unmack P. J. et al. Perspectives on the clonal persistence of presumed ‘ghost’ genomes in unisexual or allopolyploid taxa arising via hybridization. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40865-3>

Vukić, J., Marta, A., Matura, F., Kulik, D., Eisner, J., Šanda, R., ... & Janko, K. Zombie Gene Flow: Asexual Hybrids Mediate Extensive Genomic

Introgression from Extinct Species Into Their Sexual Parent. *bioRxiv*. 2025-03.

McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984. Vol. 226, no. 4676. P. 792–801. URL: <https://doi.org/10.1126/science.15739260>

de Tomás C., Vicient C. M. The Genomic Shock Hypothesis: Genetic and Epigenetic Alterations of Transposable Elements after Interspecific Hybridization in Plants. *Epigenomes*. 2023. Vol. 8, no. 1. P. 2. URL: <https://doi.org/10.3390/epigenomes8010002>

Feng, S., Pozzi, A., Opit, G., Stejskal, V., & Li, Z . Diploid genomes of the booklouse reveal evolutionary consequences of asexuality. *bioRxiv*. 2025-09.

Session A. M. et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. 2016. Vol. 538, no. 7625. P. 336–343. URL: <https://doi.org/10.1038/nature19840>

Manaresi S., Marescalchi O., Scali V. The Chromosome Complement of the Hybrid *Bacillus whitei* Complex (Insecta *Phasmatodea*). I. The paleo- and neo-standard karyotypes. *CYTOLOGIA*. 1992. Vol. 57, no. 1. P. 101–109. URL: <https://doi.org/10.1508/cytologia.57.101>

Scali V., Tinti F. Satellite DNA variation in parental and derived unisexual hybrids of *Bacillus* stick insects (*Phasmatodea*). *Insect Molecular Biology*. 1999. Vol. 8, no. 4. P. 557–564. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.00155.x>

Gabriel W., Lynch M., Bürger R. Muller's Ratchet and Mutational Meltdowns. *Evolution*. 1993. Vol. 47, no. 6. P. 1744–1757. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01266.x>

Lisachov A. et al. Genome-wide sequence divergence of satellite DNA could underlie meiotic failure in male hybrids of bighead catfish and North African catfish (*Clarias*, *Clariidae*). *Genomics*. 2024. P. 110868. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2024.110868>

Dedukh D. et al. Optional Endoreplication and Selective Elimination of Parental Genomes during Oogenesis in Diploid and Triploid Hybrid European Water Frogs. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 4. P. e0123304. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123304>

Shimizu Y. et al. Production of Diploid Eggs through Premeiotic Endomitosis in the Hybrid Medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Zoological Science*. 2000. Vol. 17, no. 7. P. 951–958. URL: <https://doi.org/10.2108/zsj.17.951>

Dedukh D., Krasikova A. Delete and survive: strategies of programmed genetic material elimination in eukaryotes. *Biological Reviews*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1111/brv.12796>

Na-Nakorn U., Rangsin W., Boon-ngam J. Allotriploidy increases sterility in the hybrid between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 2004. Vol. 237, no. 1-4. P. 73–88. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.032>

Dedukh D. et al. Meiotic deviations and endoreplication lead to diploid oocytes in female hybrids between bighead catfish (*Clarias macrocephalus*) and North African catfish (*Clarias gariepinus*). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2024. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1465335>

Chapman D. D. et al. Virgin birth in a hammerhead shark /*Biology Letters*. 2007. Vol. 3, no. 4. P. 425–427. URL: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0189>

Card D. C. et al. Genome-wide data implicate terminal fusion automixis in king cobra facultative parthenogenesis. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86373-1>

Stenberg P., Saura A. Cytology of Asexual Animals. *Lost Sex*. Dordrecht, 2009. P. 63–74. URL: https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2_4

Dedukh D. et al. Gradual chromosomal lagging drive programmed genome elimination in hemiclinal fishes from the genus *Hypseleotris*. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78278-6>

Rotelli M. D. et al. A Cyclin A–Myb–MuvB–Aurora B network regulates the choice between mitotic cycles and polyploid endoreplication cycles. *PLOS Genetics*. 2019. Vol. 15, no. 7. P. e1008253. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008253>

Sauer K. et al. Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes & Development*. 1995. Vol. 9, no. 11. P. 1327–1339. URL: <https://doi.org/10.1101/gad.9.11.1327>

Wang J. et al. Cell fusion as the formation mechanism of unreduced gametes in the gynogenetic diploid hybrid fish. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep31658>

Choleva L. et al. Synthesis Of Clonality And Polyploidy In Vertebrate Animals By Hybridization Between Two Sexual Species. *Evolution*. 2012. Vol. 66, no. 7. P. 2191–2203. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01589.x>

ANNOTATION

Obidena K. A. Study of Hybrid Sterility and Clonality in the Hybridogenetic Fish Complex *Fundulus*. – Master's Thesis. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Zoology and Animal Ecology, Kharkiv, 2025.

The master's thesis is presented on 91 pages and includes the following sections: list of abbreviations, table of contents, introduction, main part, research results, discussion, conclusions, and references. It contains 1 table, 7 figures and 198 references.

This work was carried out during an internship at the Institute of Animal Physiology and Genetics, Liběchov, Czech Republic, under the supervision of Dr Dmytro Didukh. The student participated in immunofluorescent staining of chromosomes at the pachytene stage, prepared mitotic chromosome spreads, extracted DNA, prepared PCR-based probes and assessed their quality using electrophoresis. She performed fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) on mitotic chromosome preparations, as well as immunofluorescent staining on gonadal tissue fragments. Additionally, she conducted fluorescence and confocal microscopy and processed the obtained data.

Animal reproduction includes a variety of strategies, both sexual and asexual. Sexual reproduction is the most common and provides genetic variation and evolutionary adaptability. Asexual reproduction occurs through clonal lineages, in which offspring develop without combining genetic material from both sexes. Clonal lineages often arise as a result of hybridization. Hybridization can promote the formation of new forms, but it can also create reproductive barriers between species. It often disrupts gametogenesis, reducing fertility or causing sterility.

This work focuses on gametogenesis in asexual hybrids of *Fundulus* genus, which remains poorly studied. We studied both natural clonal lineages and hybrids obtained from laboratory crosses. We collected natural hybrids from Porters Lake (Nova Scotia, Canada) and obtained laboratory hybrids at Saint Mary's University (Halifax, Nova Scotia). We used modern fluorescent microscopy and species-specific DNA probes allowed us to map tandem repeats on the chromosomes of each parental species and confirm their species specificity. Mapping these repeats in hybrids made it possible not only to distinguish hybrid individuals, but also to detect polymorphism in natural clonal hybrids compared to F1 laboratory hybrids. Further analysis of meiotic chromosomes clarified the mechanisms of gametogenesis in hybrids and explained how clonal reproduction is maintained in natural populations.

Overall, we combined cytogenetic and molecular approaches for the first time to reveal the mechanisms of clonal reproduction in *Fundulus*. We also showed, for the first time in F1 hybrids of this complex, that females are capable of producing clonal gametes through endoreplication, which ensures their fertility. Our study confirmed male sterility due to meiotic disruption and demonstrated that hybrid females can produce fertile diploid oocytes through premeiotic endoreplication.

The absence of F1 hybrids in natural populations, together with the presence of forms showing distinct patterns of tandem repeat distribution, indicates that specific clonal lineages have become evolutionarily stabilized.

Keywords: hybrids, *Fundulus*, gametogenesis, gynogenesis, clonality, sterility, asexual reproduction, meiosis, endoreplication