

Komórkowy mechanizm hybrydogenezy u zagrożonej europejskiej mieszańcowej żaby *Pelophylax grafi*

Mieszańce międzygatunkowe są znane w naturze i w hodowli. Żywotne mieszańce zwierząt – w przeciwieństwie do roślin - są rzadkie i najczęściej bezpłodne. Dzieje się tak, ponieważ chromosomy pochodzące od ojca jednego gatunku i matki drugiego gatunku zbyt różnią się. Zmieszane chromosomy mogą dobrze funkcjonować w diploidalnych ($2n$) komórkach całego ciała (somatycznych), ale nie w komórkach linii płciowej, z których tworzą się haploidalne gamety (jaja i plemniki). Nieliczne mieszańce przekroczyły tę barierę i zmodyfikowały rozród, co umożliwiło powstawanie nowych pokoleń mieszańców. Innymi słowy, mieszańce odtwarzają się z mieszańców (hybrydo-geneza), a nie bezpośrednio ze skrzyżowania się dwóch gatunków. Aby zrozumieć mechanizm hybrydogenezy należy badać go w komórkach linii płciowej, które jako jedyne w całym organizmie mają zdolność do przejścia mejozy, czyli specyficznego podziału, w wyniku którego powstają gamety ($1n$), aby po zapłodnieniu odtworzyć diploidalne ($2n$) osobniki. Kluczowym etapem prawidłowej mejozy jest utworzenie par chromosomów homologicznych (jeden odziedziczony po ojcu, drugi po matce), które umożliwiają wymianę odcinków chromosomów (rekombinację) i stworzenie nowych kombinacji cech u potomstwa. Chromosomy u mieszańców zbyt różnią się i nie tworzą prawidłowych par, mejoza przebiega nieprawidłowo i w efekcie nie tworzą się funkcjonalne gamety. U nielicznych mieszańców doszło jednak do modyfikacji gametogenezy pozwalającej na obejście tych barier. Składa się ona z dwóch etapów: eliminacji wszystkich chromosomów (genomu) jednego z gatunków rodzicielskich, a następnie replikacji pozostałych chromosomów drugiego gatunku. W ten sposób komórki przed mejozą odzyskują podwójną liczbę chromosomów, lecz każda para jest identyczna genetycznie. Mejoza może zajść bez przeszkód, jednak bez efektu rekombinacji. Do gamet przekazywane są genetyczne kopie (klony) chromosomów jednego z gatunków rodzicielskich. Mieszańce odtwarzają się w populacji dzięki połączeniu się klonalnych gamet mieszańca z gametami drugiego gatunku rodzicielskiego, który współwystępuje w tej samej populacji. Jednak w przypadku zmniejszającej się liczby osobników jednego z gatunków rodzicielskich, mieszańce krzyżują się z innymi mieszańcami, w związku z czym prowadzą do powstania neoform drugiego z gatunków, zaburzając strukturę populacji i wpływając negatywnie na jej zróżnicowanie genetyczne. Najbardziej wszechstronnie poznanym do tej pory mieszańcem hybrydogenetycznym jest żaba wodna *Pelophylax esculentus*. Badania nad nią rozpoczęły się w Polsce, a zapoczątkował je prof. Leszek Berger z Poznania, który zainspirował wielu badaczy z różnych krajów. Wszystkie komórki ciała (somatyczne) tej niezwyklej żaby mają dwa różne komplety chromosomów: jeden od żaby śmieszki (*P. ridibundus*), a drugi od żaby jeziorkowej (*P. lessonae*). Badania naszego zespołu wykazały, że eliminacja genomu zachodzi w prekursorach gamet (gonocytach) występujących tylko w okresie wczesnego rozwoju jajników i jąder u kijanek (Ogielska 1994). Eliminacja chromosomów odbywa się w interfazie na drodze tworzenia mikrojąder, które pączkują z jądra komórkowego. W każdym z mikrojąder znajduje się jeden eliminowany chromosom (Dedukh et al. 2020), lecz jest to proces niedoskonały (Chmielewska i in. 2022). Mikrojądra następnie ulegają degradacji poprzez autofagię (Chmielewska et al. 2018). Żaba wodna nie jest jedynym mieszańcem hybrydogenetycznym należącym do rodzaju *Pelophylax*. Należą do nich również *P. hispanicus* (*P. bergeri* x *P. ridibundus*) (Uzzell i Hotz 1979) oraz *P. grafi* (*P. perezi* x *P. ridibundus*) (Crochet i in. 1995). Powodem, dla którego podejmujemy te badania jest słaby stopień poznania i całkowita nieznanomość mechanizmu hybrydogenezy u tych mieszańców, co otwiera nowe możliwości badawcze. Celem projektu jest sprawdzenie czy mechanizm eliminacji chromosomów jest konserwatywny, tzn., czy zachodzi w taki sam sposób u innych mieszańców europejskich żab zielonych oraz czy, w wyniku krzyżowania się mieszańców, może on mieć wpływ na inwazyjność *P. ridibundus*. Jako model badawczy wybraliśmy *P. grafi*, gdyż zakładamy, że gametogeneza u tego taksonu jest mniej skomplikowana niż u *P. esculentus*, u którego występują osobniki triploidalne oraz jednocześnie wytwarzanie obu typów gamet zawierających chromosomy *ridibundus* i *lessonae*. Konsekwencją tego zjawiska jest wysoki odsetek degenerujących komórek linii płciowej na każdym etapie rozwoju. Jeżeli nasze założenia się potwierdzą, *P. grafi* może stać się modelem do przyszłych badań szerzej wyjaśniających podstawy hybrydogenezy. Najważniejsze spodziewane efekty to określenie: (1) jaki jest skład genomu komórek płciowych?; (2) czy mikrojądra są nośnikami wyeliminowanego genomu w gonocytach?; (3) jaki(e) typ(y) genomu(y) mieszańca przekazuje potomstwu?; (4) czy niedobór osobników *P. perezi* w populacji może prowadzić do powstania potomstwa *P. ridibundus*? Przeprowadzimy badania cytogenetyczne poprzez zróżnicowane barwienie całych genomów w gonocytach *P. grafi*, *P. ridibundus* i *P. perezi*. Badaniom poddamy kijanki o znanych genotypach uzyskane na drodze kontrolowanych krzyżówek. Następnie poddamy je analizom przy wykorzystaniu technik cytogenetycznych oraz taksonomicznych.