

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie

Doktorský studijní program: Zoologie

AUTOREFERÁT K DISERTAČNÍ PRÁCI



**Dříve evoluční ztracenci, nyní tvůrci reprodukční  
strategie: původ a reprodukce samčí linie vodních skokanů  
*Pelophylax esculentus***

Autor práce: Mgr. Marie Doležálková  
Školitel práce: RNDr. Lukáš Choleva, PhD.  
**Praha 2016**

# AUTOREFERÁT K DISERTAČNÍ PRÁCI

## PŘEDMLUVA

Autoreferát stručně popisuje obsah disertace, hlavní cíle a výsledky rukopisů včetně souhrnných závěrů. Konkrétní grafy a tabulky, na které se autoreferát odkazuje, se nachází v textu disertace a jejích přílohách.

Výzkum byl finančně podpořen grantem Univerzity Karlovy v Praze GAUK č. 383911, granty Grantové agentury České republiky GAČR 15-19947Y a GAČR č. 13-37277S.

## SOUHRN DISERTAČNÍ PRÁCE

Asexuální způsoby reprodukce jsou obvykle založeny na principu kopírování (klonování) samičí DNA do potomstva. U většiny asexuálně se množících obratlovců se potomstvo vyvíjí z neredukovaného a často neoplozeného vajíčka. Umožňuje to mechanismus partenogenetické a gynogenetické reprodukce. Zatímco v prvním případě se klonální pohlavní buňka vyvíjí spontánně a samostatně, v druhém případě je zapotřebí pohlavní partner, který aktivuje rýhování vajíčka. Ani v jednom případě však nedochází k oplodnění (splynutí spermií s vajíčkem). Klonální potomstvo proto tvoří výhradně dcery a dosavadní výzkum probíhal jen na asexuálních liniích samičího pohlaví. Vzácně mohou vznikat při pravém oplodnění klonálního vajíčka asexuální samci, ti však bývají často neplodní. Na světě jsou známí diploidní zástupci pouze tří rodů obratlovců hybridního původu, kteří disponují plodnými asexuálními samci. Jedním z nich jsou evropští zelení vodní skokani rodu *Pelophylax*, žijící také na území České republiky.

V oblastech kolem horního toku řeky Odry byly nedávno objeveny populace hybridních sameců, kteří po vzoru asexuálních samic vytváří stabilní vše-samčí linie. Výsledky této studie ukázaly, že samci tvoří klonální spermií procesem hybridogeneze, během níž je z pohlavních buněk vymazán genom matky. Pravou fertilizací dochází k oplodnění rekombinovaného vajíčka od sexuálního druhu klonálními spermií, která nese polovinu otcovské genetické informace ve formě hemiklonu. Ten je předáván z generace na generaci. Navíc, hybridní jedinci tento hemiklon sdílejí, což poukazuje na jejich společného předka. V populacích jsou dále přítomni samci schopni vytvářet současně dva typy klonálních spermií, z nichž jedny nesou mateřský a druhé

otcovský genom. Po spáření se sexuální samicí vzniká po boku potomstva hybridních hemiklonálních synů také potomstvo sexuálních dcer. Jejich potenciální evoluční role práce rovněž diskutuje.

Studium asexuální linie formující hybridní samce vodních skokanů je prvním krokem k obecnému poznání samčí asexuality, jejího vzniku a evolučního vývoje. Předložená práce diskutuje společné a odlišné rysy samicí a samčí asexuality, studuje princip persistence všesamčích populací rodu *Pelophylax* a rozšiřuje obecné poznání o původu a reprodukčních strategiích obratlovců.

## PŘEHLED RUKOPISŮ

### Rukopis I

#### **Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclonal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*?**

Marie Doležálková, Alexandr Sember, František Marec, Petr Ráb, Jörg Plötner & Lukáš Choleva

*Publikace* (Doležálková, M., Sember, A., Marec, F., Ráb, P., Plötner, J., & Choleva, L. (2016). Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclonal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*?. *BMC genetics*, 17(1), 100.)

### Rukopis II

#### **Evolution of unisexuality in reverse order: molecular insights into the origin and persistence of an all-male water frog lineage *Pelophylax esculentus***

Marie Doležálková, Nicolas B. M. Pruvost, Jörg Plötner, Heinz Ulrich-Reyer & Lukáš Choleva  
*Rukopis* (submitován: *Evolution*)

### Rukopis III

#### **When a sexual genome becomes clonal for a single generation: Evidence from *Pelophylax* water frogs**

Marie Doležálková, Marcela Doležalová, Jörg Plötner, Gaston-Denis Guex & Lukáš Choleva  
*Rukopis* (submitován: *eLife*)

## VÝZKUMNÉ CÍLE PRÁCE A JEDNOTLIVÝCH STUDIÍ

V předkládané práci jsme se zaměřili na studium populačně-genetické variability populací vodních skokanů s přítomností samčích asexuálních linií v povodí řeky Odry, porovnání s jinými liniemi *P. esculentus* a s uměle vytvořenými laboratorními liniemi hybridů a porovnali genetický profil hemiklonů L s genomem L sexuálního druhu *P. lessonae* z okolních populací. Dále jsme studovali průběh tvorby klonálních gamet a samotnou podstatu přenosu hemiklonálního genomu L do potomstva.

Hlavní otázky:

1. Jaký je průběh hybridogeneze v *P. ridibundus*-*P. esculentus*-samčích populacích povodí Odry? Kdy je mateřský genom eliminován ze zárodečných buněk?
2. Jaký je předpokládaný původ klonálně přenášených genomů u hybridních samců *P. esculentus*? Je mezi jedinci nějaká genetická variabilita klonálně přenášených genomů? Jaký je rozdíl mezi L genomy diploidních samců *P. esculentus* z povodí Odry a sexuálních druhů *P. lessonae* z okolních populací?
3. Jak se hybridní samci rozmnožují, jaký typ gamet vytváří? Existuje vazba mezi klonálně děděným genomem a pohlavím? Jaký potenciální evoluční dopad může mít vznikající potomstvo na stabilitu R-E populací?

**Rukopis I** se zabývá studiem tvorby gamet u hybridních samců *P. esculentus*. S využitím cytogenetických metod sleduje strukturu a chování rodičovských genomů v různých fázích gametogeneze. Společně s výsledky laboratorních křížení rukopisu III předkládá hypotézu o alternativním způsobu tvorby gamet, než jaké byly dosud popsány u jiných hybridogenetických organismů.

**Rukopis II** zkoumá původ pozorované samčí unisexuality. S využitím multilokusových genotypů mikrosatelitových markerů je identifikována genetická variabilita klonálně přenášených genomů, studován typ samčí reprodukce a dále jsou definovány genealogické vztahy mezi klonálně a sexuálně děděnými genomy.

**Rukopis III** tematicky navazuje na výsledky Rukopisu II, který odhaluje monofyletický původ populací hybridních samců. V této práci je experimentálně kříženo 16 hybridních samců původem z dvou přírodních populací s *P. ridibundus* samicemi pro experimentální studium vzoru dědičnosti hybridních samců, včetně vazby přenášených klonálních genomů na pohlaví potomstva.

## POUŽITÉ NÁSTROJE, METODIKY A MATERIÁL

Nástroje použité v rukopisech zařazených do disertace:

1. zpětné křížení s rodičovským druhem *P. ridibundus* (genotyp potomstva, pohlaví potomstva, míra přežívání)
2. komparativní genomová in-situ hybridizace (CGH) (detekce rodičovských genomů v premeiotických (mitotických) a meiotických fázích gametogeneze hybrida)
3. mikrosatelitové lokusy hybridních samců a jejich potomků

Použité metodiky:

Základní metody: Izolace DNA, amplifikace mikrosatelitových lokusů a fragmentační analýza mikrosatelitových repetit

Pokročilejší metody: Celogenomová komparativní *in-situ* hybridizace - CGH

Optimalizované metody pro daný taxon: Získání suspenze meiotických chromozómů z gonád juvenilních i adultních zástupců, multiplexy mikrosatelitových lokusů a zavedení metodiky pro statistické analýzy hemiklonální dědičnosti

K rukopisům zařazeným do disertační práce byl využit materiál:

1. svalová tkáň skokana ze sbírky dříve odchycených jedinců (uložených v etanolu při teplotě -20 °C až -80 °C) z oblasti Bulharska z roku 2005 (genotypu RR)
2. svalové tkáně, jaterní tkáně, kostní dřeň a pohlavních žláz odlovených subadultních a adultních skokanů z přírodních populací z ČR a Slovenska v letech 2010 - 2014 v počtu 226 jedinců (110 LL, 55 RR a 61 RL)
3. materiál získaný od zahraničních kolegů (Polsko, Prof. M. Ogielska, University of Wrocław, Německo Dr. J. Plötner, Humboldt-Universität zu Berlin),
4. svalové a jaterní tkáně laboratorně odchovaných juvenilních skokanů z křížících experimentů z roku 2013 v počtu 274 jedinců (mikrosatelitové lokusy - 60 genotypovaných RR jedinců, 88 genotypovaných RL jedinců + alozymově genotypovaných 260 jedinců z jaterní tkáně)

## PRŮBĚH VÝZKUMU A ZAHRANIČNÍ SPOLUPRÁCE

Laboratorní práce a experimenty probíhaly v molekulárně-genetických laboratořích Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově, společném pracovišti Katedry

zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a v soukromé výzkumné laboratoři spolupracující skupiny prof. D-G Guexe (Datwil, Švýcarsko).

Na výzkumu jsme spolupracovali se zahraničními kolegy:

1. Laboratoř profesora Dr. Heinz-Ulrich Reyera, Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Švýcarsko. Výzkumná skupina profesora Reyera se intenzivně věnuje řadu let evoluci, ekologii a experimentálnímu křížení forem v synkleptonu *P. esculentus*.
2. Laboratoř Dr. Jörg Plötnera, Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, 10115 Berlin, Německo. Výzkumná skupina Dr. Jörg Plötnera se věnuje skokanům synkleptonu *P. esculentus* na molekulární a genové úrovni.
3. Laboratoř profesora Prof. G-D Guex, Zoologisches Museum, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Švýcarsko. Profesor Guex se věnuje řadu let křížícím experimentům skokanů synkleptonu *P. esculentus*.

Během spolupráce se skupinou prof. H.-U. Reyera (Ecology Group, IEBES, University of Zürich) jsme úspěšně vytvořili a analyzovali rozsáhlý soubor mikrosatelitových dat vodních skokanů různých populačních typů. Během spolupráce s Prof.D-G Guexem (Zoologisches Museum, Zurich) a Dr. J. Plotnerem jsme získali potomstvo zpětného křížení hybridních samců s rodičovskými samicemi *P. ridibundus*.

## SHRNUTÍ A ZÁVĚR

Předložená práce přináší nové poznatky o dosud neprozkoumané problematice „samčí asexuality“. Dílčí výstupy se zaměřují na detailnější studium reprodukce, gametogeneze a dědičnosti hybridních hemiklonálních samců skokana zeleného v populacích v povodí horního toku řeky Odry.

Hybridní samci klonálně dědí polovinu genomu (jako hemiklon), zatímco druhá polovina genomu je každou generaci přijímána „de novo“. **První rukopis** se detailněji zabývá studiem procesu tvorby gamet u hybridních samců. S využitím techniky CGH jsme sledovali chování chromozomů v různých fázích gametogeneze (Obr. 7c, d). Na základě pozorování obou genomů v průběhu meiotického dělení jsme vyvodili dvě hlavní hypotézy. První z nich počítá s možností narušeného průběhu gametogeneze bez premeiotické eliminace, kdy vznikají

nefunkční spermie. Druhá hypotéza připouští existenci nové strategie tvorby gamet, kde nedochází k eliminaci, ale pouze k separaci genomů, a to v druhém meiotickém dělení (viz. Obr. 8).

V **druhém rukopise** jsme použili jaderné markery a definovali jsme druhově specifický hemiklon *lessonae* nazvaný „Oder L1“ přítomný u všech studovaných hybridních samců. Potvrdili jsme monofyletický původ linie a ukazujeme, že klonální *lessonae* genom hybridních samců nepochází z recentní hybridizace *P. lessonae* jedinců z okolních populací, což naznačuje starší in situ nebo ex-situ původ a přetrvávání hemiklonu po mnoho generací v rámci soběstačných hybridních samců.

**Třetí rukopis** se zaměřil na otázku dědičnosti hemiklonu „Oder L1“. Experimentálním křížením 12 hybridních samců jsme zjistili, že se v linii vyskytují dva typy samců s rozdílnou dědičností. Jedni produkují pouze gamety nesoucí hemiklon L vázaný na samčí pohlaví a druzí mohou vytvářet současně gamety s hemiklonem L a gamety s hemiklonem R vázaným na samičí pohlaví (Obr. 6), tzv. „amfispermní“ samci. V kontextu stability a udržení vše-samčí linie to znamená, že hybridní samci jsou schopni po jednu generaci „zmrazený“ R genom vrátit do genofondu populace skrze své samičí potomky a tím zajistit potenciální partnerky pro své vlastní hybridní syny.

## **ŽIVOTOPIS**

**Jméno: Marie Doležálková, Mgr.**

### **Osobní údaje, adresy a kontakty**

Narozena: 27.2.1984, Nový Jičín, Československo

Národnost: česká

Adresa domů: Na Lani 223, 74101 Nový Jičín, Česká republika

Adresa zaměstnání 1: Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika

Adresa zaměstnání 2: Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7, 128 43 Praha, Česká republika

Telefon: 776095267

Email: dolezalkova@iapg.cas.cz

Webové stránky: [www.iapg.cas.cz](http://www.iapg.cas.cz)

### **Vzdělání**

- 2005-2010 Ostravská univerzita v Ostravě (obor: Systematická biologie a ekologie)
- 2010-2016 Univerzita Karlova v Praze (obor: Zoologie)

### **Výzkumné zaměření**

- Biologie, Zoologie

### **Dosavadní zaměstnání**

- PhD. student Univerzity Karlovy v Praze
- Vědecký asistent v Laboratoři genetiky ryb v ÚŽFG v.v.i. v Liběchově

### **Současná specializace**

- Studium sexuálně-asexuálního komplexu Palearktických vodních skokanů rodu *Pelophylax* – charakter hybridizačních událostí v daném komplexu, specifita hybridogeneze u asexuálních mezidruhových hybridů *Pelophylax esculentus*, geografická distribuce odlišných populačních typů v rámci Evropy, původ polyploidních forem hybridů, stálost



asexuálních hybridních samců žijících syntopicky s rodičovským druhem *Pelophylax ridibundus*, vzor dědičnosti hybridní samčí linie s využitím křížících experimentů, chování chromozomů v průběhu hybridogeneze a jejich deviací u hybridních samců, genetický mechanismus tvorby klonálních gamet.

- Studium polyploidní linie asijských sekavek rodu *Botidae* – typ polyploidizační události v genomech tetraploidních jedinců s využitím cytogenetických metod na meiotických chromozomech.
- Studium pohlavních chromozomů vybraných skupin pavouků a pavoukoců – objasnění vzniku chromozomů u taxonů s více pohlavními chromozomy, jejich evoluce a chování v zárodečných fázích vývoje (molekulární cytogenetika a sekvenace chromozomů)

## Výuka

Seminář na Karlově Univerzitě v Praze: Proč se rozmnožovat sexuálně a k čemu vlastní samičku, když to jde i jinak: rozmnožovací strategie vše-samčích populací hybridních vodních skokanů rodu *Pelophylax*

Praktika na Karlově Univerzitě v Praze: Genetické metody: Analýza karyotypu – barvicí techniky chromozomů.

Konzultant magisterské studentky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě

Lektor studentských stáží (1.035 Vše-samčí linie zelených skokanů – stadium příbuznosti s využitím genetických markerů, 1.035 Hybridní samci vodních skokanů *Pelophylax esculentus* – dědičnost genetické informace z generace na generaci, 1.192 Horizontální přenos) v projektech popularizace výzkumu a vědy nazvaných “Otevřená věda IV a V”.

## Výzkumné projekty

1. Bakalářská práce: Populace mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) na vrchu Kožná.
2. Diplomová práce: Mezidruhový přenos mitochondriální DNA zprostředkovaný nemendelovskými hybridy: příklad vodních skokanů západního Palearktu.
3. Interní grant ÚŽFG. „Testování vhodných jaderných genetických markerů pro detekci asexuality a původu hemiklonálních linií komplexu nižších obratlovců *Pelophylax esculentus*“, r. 2010, (reg.č. projektu ÚŽFG/10/17).
4. Grant GA UK č. 383911. Evolution of male asexuality: an unique model of water frogs of the genus *Pelophylax*.

5. Grant GAČR, 2015-2017, č. 15-19947Y When a hallmark of meiosis is lost: studying the formation of clonal and hemiclonal genomes in vertebrate animals using comparative cytogenomics. Člen týmu.
6. Grant GAČR, 2013-2016, č. 13-37277S Mechanism and role of polyploidization on animal evolution.. Člen týmu.
7. A oneway transfer of mitochondrial DNA between two sexual species influenced by specific asexual (hybridogenetic) lineages.
8. Mitogenome of *Pelophylax* species: phylogeographic study.
9. Type of mitochondrial DNA and its role on physiology and survival rate in hybrid water frogs.
10. Nuclear phylogeography of European water frogs.
11. Evolution of unisexuality in reverse order: molecular insights into the origin of an all-male water frog lineage *Pelophylax esculentus*.
12. When all male hybrids produce sexual daughters and hybrid sons to reproduce themselves: Evidence from *Pelophylax* water frogs.

### **Spolupráce**

- Prof. Dr. Heinz-Ulrich Reyera, Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland.
- Dr. Jörg Plötner, Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, 10115 Berlin, Germany.
- Prof. G-D Guex from Zoologisches Museum, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland.
- Dr. Jörg Bohlen, Ph.D., Laboratoř genetiky ryb, Oddělení evoluční biologie a genetiky obratlovců, Ústav živočišné fyziologie a genetiky CAS, v.v.i., 277 21 Liběchov, Česká republika.
- Prof. RNDr. František Marec CSc., Laboratoř molekulární cytogenetiky, Entomologický ústav, Biologické centrum CAS, 370 05 České Budějovice, Česká republika.
- RNDr. Jiří Král, CSc., Katedra genetiky a mikrobiologie, obor Genetika, molekulární biologie a virologie, Univerzita Karlova v Praze, Praha, Česká republika.

## **Vědecké publikace k datu předložení disertace**

**Doležálková, M.**, Sember, A., Marec, F., Ráb, P., Plötner, J., & Choleva, L. Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? BMC genetics, 2016, 17(1), 1.

## **Konferenční příspěvky**

Symonová R., Majtánová Z., Arias-Rodriguez L., Mořkovský L., Kořínková T., Cavin L., Johnson Pokorná M., **Doležálková M.**, Flajšhans M., Ráb P., Meyer A., Bernatchez L. 2016. Molecular Cytogenomics in Gars, 14th RECOMB, Montreal, Canada.

**Doležálková M.**, Sember A., Marec F., Ráb P., Plötner J., Choleva L.: Když synové vylučují svého rodiče z budoucí generace: evoluce hemiklonální reprodukce vodních skokanů rodu *Pelophylax*. Conference of Zoology, February 2016, České Budějovice, Czech Republic. Book of abstracts.

Doležalová M., Choleva L., **Doležálková M.**, Sommermeier A., Plötner J.: Eliminace genomu jednoho rodiče během gametogeneze z pohledu epigenetiky. Conference of Zoology, February 2016, České Budějovice, Czech Republic. Poster.

Doležalová, M., **Doležálková, M.** Hybrid males of water frog *Pelophylax esculentus* – inheritance of genetic information from generation to generation. Poster, Veletrh vědy 21-23. 5. 2015, Prague, Czech republic.

**Doležálková, M.** Male gamete production of hemiclinal water frogs and its effect on sexual populations. Conference of Zoology, February 2015, Brno, Czech Republic. Book of abstracts.

**Doležálková, M.**, Choleva L. Testing the inheritance pattern of all-male hybrid water frogs in the upper Odra River Basin. Conference of Zoology, February 2014, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts.

**Doležálková, M.**, Sember, A., Choleva, L. Meiosis and mitosis in hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* using Genomic In Situ Hybridization. Conference of Zoology, February 2013, Brno, Czech Republic. Book of abstracts. Choleva, L., Bílá, M.,

**Doležálková, M.**, Choleva, L. Mezidruhový přenos mitochondriální DNA: studium role asexuálních hybridů a ancestrálního polymorfismu na příkladu vodních skokanů západního Palearktu. Conference of Zoology, February 2011, Brno, Czech Republic. Book of abstracts.

- Doležálová, M.** Mezidruhový přenos mitochondriální DNA zprostředkovaný nemendelovskými hybridy: příklad vodních skokanů západního Palearktu. Ostrava, 2010. 75 s. Diplomová práce. Ostravská univerzita.
- Doležálová, M.**, Domanská, S., Chovančíková, J., Matějovová, D., Majtánová, Z., Řezníčková, J., Lojkásek, B. "Dynamics" in lower vertebrate populations: natural or mediated by a human? Environmental changes and biological assessment IV., Department of Biology and Ecology, University of Ostrava. April 10-11, 2008, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts, p. 42. Poster presentation.
- Doležálová, M.** Populace mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) na vrchu Kožná. Ostrava, 2008. 77 s. Bakalářská práce. Ostravská univerzita.
- Choleva, L., Bílá, M., **Doležálová, M.**, Domanská, S., Chovančíková, J., Matějovová, D., Majtánová, Z., Řezníčková, J., Lojkásek, B. "Dynamics" in lower vertebrate populations: natural or mediated by a human? Environmental changes and biological assessment IV, Department of Biology and Ecology, University of Ostrava. April 10-11, 2008, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts, p. 42. Poster presentation.

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of zoology

Ph.D. study program: Zoology

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS



**Earlier evolutionary dead-ends, now the creators of a reproductive strategy: the origin and reproduction of the all-male water frog lineage *Pelophylax esculentus***

Author: Mgr. Marie Doležálková  
Supervisor: RNDr. Lukáš Choleva, PhD.

**Prague 2016**

# **SUMMARY OF THE DISSERTATION THESIS**

## PREFACE

The summary briefly describes the contents of the Thesis, the main objectives and outcomes of manuscripts, including summary conclusions. Particular graphs and tables, to which summary refers to, are located in the text of the dissertation Thesis and its appendixes.

The research was financially supported by a grant from the Charles University, Prague, GAUK no. 383911, the grants from the Czech Grant Agency GACR 15-19947Y and GACR no. 13-37277S.

## SUMMARY OF THE THESIS

Asexual modes of reproduction are usually based on the principle of copying (cloning) DNA from the female and passing it on to the offspring. For most asexually reproducing vertebrates the progeny develop from an unreduced and often unfertilised egg. This is driven by the mechanisms of parthenogenetic and gynogenetic reproduction. While in the former the clonal germ cell develops spontaneously and separately, in the latter a sexual partner is needed to activate the cleavage of the ovum, although without the fusion of the sperm and egg. Therefore in both cases there is no fertilization and the clonal progeny consist solely of daughters, hence the majority of previous studies have only focused on asexual female lineages. However, on rare occasions asexual clonal males can arise when the right fertilization occurs. Whilst these offspring are usually infertile, fertile diploid asexual males have been discovered in just three genera of hybrid origin in vertebrates. One of these unique cases is the European water frog complex of the genus *Pelophylax*, whose distribution includes the Czech Republic.

In areas around the upper Odra River populations of hybrid males were recently discovered who form stable all-male lineages, similar to those formed by asexual females. The results of this study show that males produce clonal sperm by hybridogenesis when the maternal genome is eliminated from the germ cells. By true fertilization, the recombinant egg from a sexual female is fertilized by a clonal sperm bearing half of the paternal genetic material in the form of a "hemiclone". The hemiclone is passed from generation to generation, and is shared by these hybrid individuals, suggesting that they also share a common ancestor. In the all-male

populations males also exist who can simultaneously generate two types of clonal sperm, one carrying the maternal genome and the other the paternal. After mating with the sexual female, the offspring of sexual females arise alongside the hybrid offspring of hemiclonal male descendants. Their potential evolutionary role is also discussed here.

The study of the asexual lineages of hybrid male water frogs is the first step to general understanding of male asexuality, its origin and evolutionary development. The presented work highlights the common and differing features of male and female asexuality, studies the principal of persistence of all-male populations of the genus *Pelophylax* and expands the overall knowledge about the origin and reproductive strategies of vertebrates.

## LIST OF MANUSCRIPTS

### Manuscript I

#### **Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclonal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*?**

Marie Doležálková, Alexandr Sember, František Marec, Petr Ráb, Jörg Plötner & Lukáš Choleva

*Publication* (Doležálková, M., Sember, A., Marec, F., Ráb, P., Plötner, J., & Choleva, L. (2016).

Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclonal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*?. *BMC genetics*, 17(1), 100.)

### Manuscript II

#### **Evolution of unisexuality in reverse order: molecular insights into the origin and persistence of an all-male water frog lineage *Pelophylax esculentus***

Marie Doležálková, Nicolas B. M. Pruvost, Jörg Plötner, Heinz Ulrich-Reyer & Lukáš Choleva  
*Manuscript* (submitted in *Evolution*)

### Manuscript III

#### **When a sexual genome becomes clonal for a single generation: Evidence from *Pelophylax* water frogs**

Marie Doležálková, Marcela Doležalová, Jörg Plötner, Gaston-Denis Guex & Lukáš Choleva  
*Manuscript* (submitted in *eLife*)

## RESEARCH GOALS AND OBJECTIVES INCLUDED IN THE MANUSCRIPTS

In the presented work, we focused on the study of population-genetic variability within populations of water frogs with the presence of male asexual lineages in the Odra River Basin, compared with other lineages of *P. esculentus* and with laboratory crossed hybrids and compared the genetic profile of hemiclones L with the genome L of the sexual species *P. lessonae* from the surrounding populations. Furthermore, we studied the process of forming clonal gametes and the inheritance pattern of the hemiclone L to the progeny.

Main questions:

1. What is the process of hybridogenesis in *P. ridibundus*-*P. esculentus*-male population from the Upper Oder River? When is the maternal genome eliminated from the germ cells?
2. What is the putative origin of clonally inherited genomes in hybrid males of *P. esculentus*? Is there any genetic variability of clonally transmitted genomes between individuals? What is the difference between genomes L in diploid males of *P. esculentus* from Odra River Basin and sexual species *P. lessonae* from populations in the surrounding area?
3. What is the reproductive pattern of hybrid males, which type of gametes they produce? Is there any connection between inherited clonal genome and sex? What potential evolutionary impact can have the progeny on a stability of the R-E populations?

**Manuscript I** deals with the study of gamete production in hybrid males *P. esculentus*. Using cytogenetic methods, we monitored the structure and behavior of parental genomes in different stages of gametogenesis. Together with the results of laboratory crosses in Manuscripts III, we presented the hypothesis of an alternative method of gametes production than it is known in other hybridogenetic organisms.

**The manuscript II** examines the origin of the observed male unisexuality. Using multilocus genotypes of microsatellite markers we identified the genetic variability of clonally transmitted genomes, we studied a type of male reproduction and we defined the genealogical relationships between clonally and sexually inherited genomes.

**Manuscript III** is thematically linked to the results of the Manuscript II, which confirmed the monophyletic origin of hybrid male populations. In this work, 16 hybrid males originating from two natural populations are crossed with *P. ridibundus* females for experimental study of the



inheritance pattern of hybrid males, including linkage of clonally transmitted genomes to the sex of the offspring.

## USED TOOLS, METHODS AND MATERIALS

Tools of the manuscripts included in the dissertation thesis:

1. backcrossing with parental species *P. ridibundus* (genotype of progeny, sex determination, survival rate)
2. genomic in situ hybridization (CGH) (detection of parental genomes in premeiotic (mitotic) and meiotic stages of hybrid gametogenesis)
3. microsatellite loci of hybrid males and their offspring

Used methodology:

Basic methods: DNA isolation, amplification of microsatellite loci and fragment analysis of microsatellite repeats

Advanced methods: Comparative genomic in-situ hybridization - CGH

Optimized methods for a given taxon: Making suspensions of meiotic chromosomes from the gonads of juvenile and adult individuals, multiplexes of microsatellite loci and implementing a methodology for statistical analysis of hemiclonal inheritance

Material used in the projects included in the dissertation thesis:

1. muscle tissue of one water frog from the collection of previously trapped individuals (stored in ethanol at -20 °C to -80 °C) in the area of Bulgaria from 2005 (genotype RR)
2. muscle tissue, liver tissue, bone marrow and gonads from subadult and adult frogs from natural populations from the Czech Republic and Slovakia in 2010 - 2014 in the number of 226 individuals (110 LL, 55 RR and 61 RL)
3. The material from foreign colleagues (Poland, Prof. M. Ogielska, University of Wroclaw, Germany Dr. J. Plötner, Humboldt-Universität zu Berlin)
4. muscle and liver tissues of laboratory-reared juvenile frogs from interbreeding experiments from 2013 in the number of 274 individuals (microsatellite loci - RR genotyped 60 individuals, 88 individuals genotyped RL + 260 aozyme-genotyped individuals of liver tissue)

## REALIZATION OF RESEARCH AND INTERNATIONAL COOPERATION

Lab work and experiments were conducted in molecular genetic laboratories of the Institute of Animal Physiology and Genetics, v.v.i. Liběchov, in collaborate workplace Department of Zoology, Faculty of Charles University in Prague and in private research laboratories cooperating group of prof. D-G Guexe (Datwil, Switzerland).

On research, we cooperated with foreign colleagues:

1. Laboratory of Professor Dr. Heinz-Ulrich Reyer, Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland. The research group of Prof. Reyer is strongly committed to a series of years of evolution, ecology and experimental crossings of hybrid *P. esculentus*.
2. Laboratories Dr. Jörg Plötnera, Museum für Naturkunde Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, 10115 Berlin, Germany. The research group of Dr. Jörg Plötner dedicated to water frogs at the molecular and genetic level.
3. The laboratory of Professor Prof. G-D Guex, Zoologisches Museum, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland. Professor Guex dedicated many years to crossings experiments of hybrid *P. esculentus*.

During the cooperation with the group of prof. H.-U. Reyer (Ecology Group, IEBES, University of Zurich) we have successfully created and analyzed extensive data set of microsatellite water frogs of different population types. During the collaboration with Prof.D-G Guex (Zoologisches Museum, Zurich) and Dr. J. Plotner we got backcross progeny of hybrid males with parental females *P. ridibundus*.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Submitted work provides new insights about the unexplored issue of "male asexuality." Individual outputs focus on a detailed study of reproduction, gametogenesis and heredity of hybrid hemiclinal males of *P. esculentus* in populations around the Odra River basin.

Hybrid males clonally inherit half of the genome (as a hemiclone), while the other half of the genome is restored each generation "de novo". **The first manuscript** studied the process of gamete formation in hybrid males in more detail. Using CGH, we monitored the behavior of

chromosomes in different stages of gametogenesis (Fig. 7c, d). Based on observations of both genomes during late meiotic divisions we have deduced two major hypotheses. The first hypothesis allows the possibility of disturbed process of gametogenesis without premeiotic elimination when nonfunctional sperms are formed. The second hypothesis acknowledges the existence of the new strategy of gamete formation, when instead of the elimination genomes are only separated in the second meiotic division (see. Fig. 8).

In **the second manuscript** we used nuclear markers to define a species-specific *lessonae* hemiclone called "Oder L1" present in all studied hybrid males. We confirmed a monophyletic origin of the lineage and showed that clonal *lessonae* genome did not recently originate from the adjacent *P. lessonae*, suggesting an older *in situ* or *ex-situ* origin and perpetuation over many generations within self-persisting all-male animals.

**The third manuscript** focused on the question of inheritance of hemiclone "Oder L1". By experimental crosses of 12 hybrid males we found that in the lineage there exist two types of males with different inheritance pattern. Some males produce only gametes carrying hemiclone L link to the male sex and others can form at once gametes with hemiclone L and hemiclone R link to the female sex (Fig. 6), so-called. "amhisperm" males. In the context of stability and maintainance of the all-male lineage, this means that hybrid males are able to return for one generation "frozen" R genome into the gene pool of the population through their female offspring thus providing potential partners for its own hybrid sons.

## **CURRICULUM VITAE**

**Name: Marie Doležálková, MSc.**

### **Personal information, addresses and contacts**

Born: 27.2.1984, Nový Jičín, Czechoslovakia

Nationality: Czech

Home address: Na Lani 223, 74101 Nový Jičín, Czech Republic

Work address 1: Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of Czech Republic, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Czech Republic

Work address 2: Department of Zoology, Faculty of Sciences, Charles University, Viničná 7, 128 43 Prague, Czech Republic

Phone number: 776095267

Email: dolezalkova@iapg.cas.cz

Web site: www.ipag.cas.cz

### **Education**

- 2005-2010 University of Ostrava (section: Systematic biology and ecology)
- 2010-2016 Charles University in Prague (MSc in Zoology)

### **Research interest**

- Biology, Zoology

### **Professional appointments**

- PhD. student of Charles University in Prague
- Scientific employee in the Laboratory of fish genetics in IAPG in Liběchov

### **Current specialization**

Study of sexual-asexual complex of Palearctic water frogs of the genus *Pelophylax* – character of hybridization events in this complex, specificity of hybridogenesis in asexual interspecies hybrid *Pelophylax esculentus*, geographical distribution of different population types in Europe, origin of polyploid hybrids, persistence of asexual hybrid males in mixed population type where they lived syntopically with *Pelophylax ridibundus*, inheritance pattern of hybrid lineages

through crossing experiments, chromosome behaviour during hybridogenesis and its deviations in hybrid males, genetic mechanism of clonal gamete production.

Study of a polyploid lineage of asian fish of the genus *Botidae* – type of polyploidization events in the genomes of tetraploid fish using gonadal suspensions of meiotic chromosomes.

Study of sex chromosomes in selected groups of spiders and arachnids – the origin of sex chromosomes in taxa with multiple sex chromosomes, their evolution and behaviour in the embryonic stages of development (molecular cytogenetics and sequencing of chromosomes)

### **Teaching**

Seminar at Charles University in Prague: Why to reproduce sexually and why to use own females when it could be done another way: a reproductive strategy of all-male hybrid populations of water frogs of the genus *Pelophylax*.

Seminar at Charles University in Prague: Genetic methods: Analysis of karyotypes – chromosomal staining techniques.

Consultant of 1 MSc candidate, Faculty of Sciences, University of Ostrava

Lecturer student internships (1.035 All-male lineage of green water frogs – a study of genetic relationship using genetic markers, 1.035 Hybrid males of water frog *Pelophylax esculentus* – inheritance of genetic information from generation to generation, 1.192 Horizontal transfer) in a project popularisation of research and development called „Open science IV and V“.

### **Research projects**

1. Bachelor's thesis: Population of *Salamandra salamandra* on the hill Kožná.
2. Diploma thesis: Interspecific transfer of mitochondrial DNA via non-Mendelian hybrids: a case in Western Palearctic water frogs.
3. Internal grant AV CR. Testing of nuclear genetic markers for detection of asexuality and origin of hemiclinal lineages in a low-vertebrate complex of *Pelophylax esculentus*., r. 2010, (registration number of project ÚŽFG/10/17).
4. Grant GAUK no. 383911. Evolution of male asexuality: a unique model of water frogs of the genus *Pelophylax*. Grant Agency of Charles University in Prague. 2011-2013.
5. Grant no. 15-19947Y When a hallmark of meiosis is lost: studying the formation of clonal and hemiclinal genomes in vertebrate animals using comparative cytogenomics. GAČR, 2015-2017. Team member.
6. Grant no. 13-37277S Mechanism and role of polyploidization on animal evolution. GAČR, 2013-2016. Team member.

7. An oneway transfer of mitochondrial DNA between two sexual species influenced by specific asexual (hybridogenetic) lineages.
8. Mitogenome of *Pelophylax* species: phylogeographic study.
9. Type of mitochondrial DNA and its role on physiology and survival rate in hybrid water frogs. (in reparation).
10. Nuclear phylogeography of European water frogs.
11. Evolution of unisexuality in reverse order: molecular insights into the origin of an all-male water frog lineage *Pelophylax esculentus*.
12. When all male hybrids produce sexual daughters and hybrid sons to reproduce themselves: Evidence from *Pelophylax* water frogs.

### **Cooperation with researcher partners**

Prof. Dr. Heinz-Ulrich Reyer, Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland.

Dr. Jörg Plötner, Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, an der Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstraße 43, 10115 Berlin, Germany.

Prof. G-D Guex from Zoologisches Museum, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland.

Dr. Jörg Bohlen, Ph.D., Laboratory of Fish Genetics, Department of Vertebrate Evolutionary Biology and Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics CAS v.v.i, 277 21 Liběchov, Czech Republic.

Prof. RNDr. František Marec CSc., Laboratory of Molecular Cytogenetics, Institute of Entomology, Biology Centre CAS, 370 05 České Budějovice, Czech Republic.

RNDr. Jiří Král, CSc., Department of genetics and microbiology, specialization: Genetics, molecular biology and virology, Charles University, Prague, Czech Republic.

### **Scientific publications on the date of submission of thesis**

**Doležálková, M.,** Sember, A., Marec, F., Ráb, P., Plötner, J., & Choleva, L.. Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? BMC genetics, 2016, 17(1), 1.

## Conference presentations

- Symonová R., Majtánová Z., Arias-Rodriguez L., Mořkovský L., Kořínková T., Cavin L., Johnson Pokorná M., **Doležálková M.**, Flajšhans M., Ráb P., Meyer A., Bernatchez L. 2016. Molecular Cytogenomics in Gars, 14th RECOMB, Montreal, Canada.
- Doležálková, M.**, Sember, A., Marec F., Ráb P., Plötner J., Choleva L.: When sons exclude one of their parents from the future generations: evolution of hemiclinal reproduction in water frog hybrids of the genus *Pelophylax*. Conference of Zoology, February 2016, České Budějovice, Czech Republic. Book of abstracts.
- Doležalová, M., Choleva, L., **Doležálková, M.**, Sommermeier, A., Plötner, J. Elimination of the genome of one parent during gametogenesis from the perspective of epigenetics. Conference of Zoology, February 2016, České Budějovice, Czech Republic. Poster.
- Doležalová, M., **Doležálková, M.** Hybrid males of water frog *Pelophylax esculentus* – inheritance of genetic information from generation to generation. Poster, Veletrh vědy 21-23.5.2015, Prague, Czech Republic.
- Doležálková, M.** Male gamete production of hemiclinal water frogs and its effect on sexual populations. Conference of Zoology, February 2015, Brno, Czech Republic. Book of abstracts.
- Doležálková, M.**, Choleva, L. Testing the inheritance pattern of all-male hybrid water frogs in the upper Odra River Basin. Conference of Zoology, February 2014, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts.
- Doležálková, M.**, Sember, A., Choleva, L. Meiosis and mitosis in hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* using Genomic In Situ Hybridization. Conference of Zoology, February 2013, Brno, Czech Republic. Book of abstracts.
- Doležálková, M.**, Choleva, L. Interspecific transfer of mitochondrial DNA: study of a role of asexual hybrids and ancestral polymorphism in a case of Palearctic water frogs. Conference of Zoology, February 2011, Brno, Czech Republic. Book of abstracts.
- Doležálková, M.** Interspecific transfer of mitochondrial DNA via non-Mendelian hybrids: a case in Western Palearctic water frogs. Ostrava, 2010. 75 p. diploma thesis, University of Ostrava.
- Doležálková, M.**, Domanská, S., Chovančíková, J., Matějovová, D., Majtánová, Z., Řezníčková, J., Lojkásek, B. "Dynamics" in lower vertebrate populations: natural or mediated by a human? Environmental changes and biological assessment IV., Department of Biology and Ecology, University of Ostrava. April 10-11, 2008, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts, p. 42.

**Doležalková, M.** Population of *Salamandra salamandra* on the hill Kožná. Ostrava, 2008. 77 p. bachelor thesis, University of Ostrava.

Choleva, L., Bílá, M., **Doležalková, M.**, Domanská, S., Chovančíková, J., Matějovová, D., Majtánová, Z., Řezníčková, J., Lojkásek, B. "Dynamics" in lower vertebrate populations: natural or mediated by a human? Environmental changes and biological assessment IV., Department of Biology and Ecology, University of Ostrava. April 10-11, 2008, Ostrava, Czech Republic. Book of abstracts, p. 42. Poster presentation.