

## АНОТАЦІЯ

Дрогваленко М.О. Різноманіття складу геміклональних популяційних систем *Pelophylax esculentus* complex в Україні та чинники, що підтримують їхню стійкість. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктор філософії з спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2023.

Дисертаційне робота присвячена дослідженню внутрішньо-популяційних процесів геміклональних популяційних систем зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex України, а саме їхнього складу, онтогенетичних особливостей різних генетичних форм зелених жаб, а також характеру добору серед потомства як одного з механізмів, що підтримують стале існування таких систем, та його взаємозв'язку з генетичним різноманіттям геномів. Складовими роботи стали опис нових і аналіз динаміки вже відомих ГПС всієї України (басейнів Дунаю, Західного Бугу, Дніпра в широкому сенсі) і басейну Сіверського Донця зокрема; дослідження розвитку зелених жаб у природних умовах та в умовах експериментальних схрещувань, а також реєстрація аномалій різного характеру (аномалії розвитку, фенологічні аномалії); молекулярне та цитологічне дослідження різних популяційних систем та експериментального потомства окремих їхніх представників.

Робота була здійснена з використанням матеріалу, що включав в себе колекції та базу даних лабораторії Популяційної екології амфібій (ХНУ імені В.Н. Каразіна, кафедра Зоології та Екології тварин) та Музею Природи ХНУ імені В.Н. Каразіна, дані з персонально проведених експедиційних досліджень, а також матеріалу, отриманого шляхом експериментальних лабораторних схрещувань зелених жаб, відловлених у природних ГПС. Морфологічна частина дослідження включала в себе видову та статеву ідентифікацію за зовнішньо-морфологічними (забарвлення та пропорції тіла) та/або внутрішньо-морфологічними (морфологія гонад) ознаками тварин в польових та/або

лабораторних умовах, а також проміри розмірів тіла. Цитологічні дослідження включали в себе виготовлення препаратів крові та аналіз довжини еритроцитів (середня довжина довгої осі клітин) в якості показника для попередньої оцінки плідності (і, в подальшому, особливостей онтогенезу загалом); каріологічна частина включала в себе безпосередню оцінку плідності піддослідних тварин шляхом виготовлення препаратів метафазних хромосом та підрахунку каріотипу (кількість хромосом чи ядерцевих організаторів); подальший розвиток методики включав забарвлення препаратів Гімзою, DAPI чи застосування методики FISH (для точного генотипування тварин). Молекулярні методи включали мікросателітний аналіз видоспецифічних та крос-специфічних локусів та/або аналіз видоспецифічних SNP у послідовності гену *uqcrfs1*. Статистичний аналіз отриманих результатів проводився у середовищі R з використанням пакетів ggplot2, tidyverse, outliers, reshape, gridExtra, ggforce, dunn.test, extraoperators, corrplot.

Дослідження різноманіття складу ГПС України виявило розповсюдження L-E, R-E, L-E-R типів ГПС на території України, без ознак присутності систем E-типу. Вперше описано склад геміклональних систем території Чорнобильської Зони відчуження, РЛП «Сеймського», уточнено склад ГПС басейнів річок Сіверський Донець (з притоками), Мерла, Удай (з притоками), Псел (з притоками), Прут, Західний Буг.

Динаміка п'яти модельних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття, проаналізована на базі багаторічного моніторингу, продемонструвала внутрішні відмінності, притаманні ГПС навіть того самого R-E-Er типу, що стосуються мінливості їхнього складу (описуваного в термінах трьох форм: *P. ridibundus*,  $2n$  та  $3n$  *P. esculentus*).

Встановлено, що розповсюдження ГПС, що містять в своєму складі триплоїдів, може бути ширшим, ніж передбачалося. Нові потенційні локалітети поширення триплоїдних *P. esculentus* включають в себе ГПС Чорнобильської Зони, Пониззя Дніпра (Гола Пристань) та північні притоки української течії Сіверського Донця (для яких раніше триплоїди не фіксувалися).

Зареєстровано існування R-E ГПС в басейні р. Оскол (НПП «Дворічанський» та м. Дворічна), для якого поширення гібридів раніше не наводилося.

Ґрунтуючись на існуючих техніках допоміжних репродуктивних технологій для безхвостих амфібій, було розроблено і успішно впроваджено оригінальну методику прижиттєвого штучного схрещування зелених жаб.

Показано, що морфологія пуголовків різних генетичних форм *P. esculentus* complex за певних умов (аналізу пуголовків певного віку) дозволяє розрізняти ці генетичні форми. Аналіз можливий на основі і якісних (особливості забарвлення), і кількісних ознак (багатовимірний аналіз промірів тіла).

Для ряду популяційних систем показано існування спектру аномалій (порушень) розвитку, що, вірогідно, мають генетичне підґрунтя, а отже, вірогідно, слугують в якості одних з тих самих онтогенетичних механізмів, що забезпечують стійке існування ГПС з покоління в покоління. До таких аномалій можна віднести затримку розвитку (не вступання у метаморфоз) чи ранні порушення розвитку (морфологічні вади) серед пуголовків певних генетичних форм, спостережувану гетерохронію у гібридів Іськова ставка та навіть вади, що зберігаються до постметаморфічного віку (вади розвитку кінцівок).

Фенологічні аномалії, зареєстровані як для популяцій батьківського виду (*P. ridibundus*), так і для популяційних систем, як припускається, також здатні відігравати роль фактору пластичності ГПС – наприклад, забезпечуючи мінливість розмноження та строків розвитку в природі всіх чи деяких форм.

Онтогенетичні показники різних ГПС (довжина еритроцитів і довжина тіла у різних видів та гібридів різної плоїдності) продемонстрували значну мінливість між системами, причому і на рівні дорослих тварин, і на рівні ювенілів. Для ювенільних особин показник довжини еритроцитів слід застосовувати особливо обережно. Показано, що для пуголовків та цьогорічок цей показник має потенціал для застосування, межі якого ще слід вивчити.

Описаний зв'язок різноманіття геномів, характеру гаметогенезу та добору серед у ГПС Іськова ставка. Висока клональність L-геномів тут поєднується з високим різноманіттям R-геномів, що свідчить про значну роль рекомбінації, яка перебігає тут, вочевидь, у нечисленних *P. ridibundus* і, гіпотетично, LRR-*P.*

*esculentus*. Суттєва (або повна) елімінація припускається для потомства обох батьківських генотипів, частини диплоїдних та триплоїдних гібридів.

Ґрунтуючись на аналізі генотипів пуголовків та цьогорічок, описана внутрішньо-популяційна динаміка ГПС Корякового яру. Припускається зв'язок цієї ГПС з різноманітною ГПС зелених жаб заплави Сіверського Донця. Елімінація батьківських видів відбувається тут більш подовжено; припускається елімінація диплоїдних гібридів на ранніх етапах розвитку та/або продукція суттєвої кількості диплоїдних гамет.

Вперше детально описано склад і запропонована схема розмноження для ГПС унікального складу біля м. Кремінна та с. Брусівка R-Erf типу. Триплоїдні самиці *P. esculentus* з генотипом LLR (єдина гібридна форма) співіснують тут з обома статями *P. ridibundus*; самців цього виду LLR-самиці використовують для відтворення самих себе. В їхньому потомстві відбувається елімінація обох статей LR-гібридів, а також LLR-самців – *P. ridibundus* не відтворюються. Припускається, що LLR-самиці або передають суміш L- та LL-гамет, або гаплоїдні L-геноми подвоюються в деяких ікринках після запліднення.

За допомогою штучних схрещувань продемонстрована амфіспермія LR-самців в ГПС Журавлівського Гідропарку, а також (на основі спостережень) припускається циркулювання лише чоловічих L-геномів у системі. Запропоновано закономірності добору.

В ГПС с. Тимченки показано наявність триплоїдів лише одного генотипу LLR та запропоновано схему розмноження і добору. Суттєва кількість шляхів гаметогенезу, відома для населяючих цю ГПС форм гібридів, дозволяє припустити значну кількість варіантів добору серед їхнього потомства.

Наукова новизна роботи полягає у вивченні складу ГПС нових локалітетів України, до цього не охоплених спеціальними дослідженнями геміклональних популяційних систем, включаючи природоохоронні території. Показане ширше, ніж вважалося до того, поширення триплоїдних *P. esculentus* в Україні. Вперше досліджено склад, генетичне різноманіття і динаміку унікальних R-Erf ГПС нижньої течії українського Сіверського Донця. Вперше підсумована багаторічна динаміка складу, морфологічних і цитологічних показників у кількох ГПС

Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Досліджено характер розмноження, добору і різноманіття геномів у ряді модельних ГПС. Виявлено морфологічні відмінності раннього розвитку різних форм *P. esculentus* complex; також виявлені їхні морфологічні та фенологічні аномалії розвитку і розмноження. Розроблено і випробувано нову методику прижиттєвого схрещування жаб.

Практичне значення результатів роботи полягає у розширенні відомостей щодо різноманіття комплексу європейських зелених жаб в Україні, зокрема унікальних та виключно складних систем. Отримані на порівняно багатому українському матеріалі дані дають можливість поглибити наші знання про еволюцію гібридних комплексів як на молекулярному, так і на популяційному рівнях.

**Ключові слова:** зелені жаби, пуголовки, гібриди, онтогенез, стадії розвитку, добір, елімінація, розмноження, гаметогенез, склад популяційних систем, мікросателітний аналіз, штучні схрещування, геноми

## ANNOTATION

Drohvalenko M.O. Composition diversity of *Pelophylax esculentus* complex hemiclinal population systems in Ukraine and the factors maintaining their stability/ – Qualifying scientific work on manuscript rights.

The dissertation for a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 091 – «Biology» (09 – Biology). – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2023.

Dissertation is dedicated to the study of intra-population processes in hemiclinal population systems of water frogs *Pelophylax esculentus* complex in Ukraine, namely their composition, ontogenetic features of different genetic forms and the features of selection among progeny, as one of the mechanisms maintaining the stable existing of such systems, and its relation to the genomes' genetic diversity. The work is composed of the description of the new and dynamic analysis of already known HPS of Ukraine (Dunai, Western Buh, Dnipro basins *sensu lato*) and Siverskyi Donets basin in particular; the investigation of water frogs' development in natural conditions and in conditions of experimental crossings, along with registration of different anomalies (developmental, phenological); molecular and cytological study of different population systems and experimental progeny from some of their members.

The work was conducted using material from the collection and database of Amphibian population ecology laboratory (KhNU, Zoology and Animal Ecology department) and KhNU Natural Museum, from the personally conducted expeditions, from the experimental laboratory crossings of water frogs collected in natural HPS. Morphological work consisted of species and sex identification by external (body colocation and proportions) and internal (gonadal morphology) traits in the field and/or laboratory conditions, and measuring of the body size. Cytological study included the preparation of blood slides and measuring of erythrocyte long-axis lengths as a preliminary estimator of ploidy (and, later, of ontogenetic features); karyological study included the direct estimation of ploidy in studied animals via preparation of metaphase chromosomes slides and karyotype counting (chromosomes of nucleoli); further

method development included the Giemsa or DAPI staining, or FISH application for precise genotyping. Molecular method included the microsatellite analysis of species-specific and cross-specific loci and/or analysis of species-specific SNPs in *uqcrfs1* gene sequence. Statistical analysis of obtained results was conducted using R with ggplot2, tidyverse, outliers, reshape, gridExtra, ggforce, dunn.test, extraoperators, and corrplot packages.

The study on HPS diversity in Ukraine found the distribution of L-E, R-E, and L-E-R HPS types in Ukraine without signs of systems of E-type. For the first time, the composition of population systems in Chornobyl Zone and “Seimskyi” RLP was described, composition of HPS in Siverskyi Donets (with tributaries), Merla, Udai (with tributaries), Psel (with tributaries), Prut and Western Buh was specified.

The dynamics of five model population systems in Siverskyi Donets diversity center, analyzed based on long-term monitoring data, demonstrated the internal differences, intrinsic to HPS even of the same R-E-Ep type, which concern their composition (described in terms of three forms: *P. ridibundus*,  $2n$  та  $3n$  *P. esculentus*).

It was established that the distribution of triploid-containing HPS may be wider than previously expected. The new potential sites of triploid *P. esculentus* distribution include HPS of Chornobyl Zone, lower stretches of Dnipro (Hola Prystan) and some northern tributaries of Ukrainian flow of Siverskyi Donets (where triploids had not been registered).

The R-E HPS was registered in the basin of Oskol river (NP “Dvorichanskyi” and Dvorichna city), where hybrids had not been not found before.

Based on the existing assisted reproductive technologies for anurans, there was developed and successfully implemented an original method for intravital artificial crossing of water frogs.

It was shown that the tadpole morphology of different genetic forms of *P. esculentus* complex allows under certain conditions (analysis of tadpoles in certain age) to distinguish all these forms. The analysis may involve as qualitative (coloration features), as quantitative (multidimensional analysis of body measurements) features.

It was shown that in the set of population systems the spectrum of developmental anomalies (disturbances) exists, which probably have genetic background and thus

probably serve as one of those ontogenetic mechanisms maintaining the stable existence of HPS through generations. As such anomalies we can consider the developmental retardment (avoiding metamorphosis) or early developmental disturbances (morphological malformations) among the tadpoles of certain genetic forms, heterochrony observed in Iskiv pond hybrids, or even malformations remaining till the juvenile age (limb malformations).

Phenological anomalies, registered as for parental species (*P. ridibundus*), as for population systems may presumably also serve as factor of HPS plasticity – for instance, establishing the variability of breeding and development terms in nature for some or all the forms.

Ontogenetic features in different HPS (erythrocyte length and body size in different species and hybrids of different ploidy) demonstrated a noticeable variability among the systems, moreover, as in adults, as in juveniles. Erythrocyte length as the estimator should be applied especially carefully for juveniles. It was shown that for the tadpoles and froglets this estimator has the certain potential, which limits are yet to be studied.

The link between genome diversity, gametogenesis features and selection among progeny was shown for Iskiv pond HPS. The high clonality of L-genomes is matched here with high diversity of R-genomes, that shows the significant role of recombination occurring here probably in few *P. ridibundus* and, hypothetically, LRR-*P. esculentus*. Significant (or full) elimination of progeny of both parental genotypes and the part of diploid and triploid hybrids is suggested.

Based on genotyping of tadpoles and froglets, the intra-population dynamics of Koriakiv HPS was described. It is suggested the link between this system with the diverse HPS of Siverskyi Donets floodplain. The elimination of parental genotypes is more extended here; it is also suggested the partial elimination of diploid hybrids in early development and/or production of a substantial amount of diploid gametes.

For the first time the composition was described in detail and the reproduction scheme was suggested for unique R-Epf HPS near Kreminna city and Brusivka village. Triploid *P. esculentus* females with genotype LLR (as the only hybrid form) co-exist here with *P. ridibundus* of both sexes; the marsh frog males are used by LLR-females for self-reproduction. In their progeny, LR-hybrids of both sexes and LLR-males are



eliminated – and *P. ridibundus* are absent. It is suggested that LLR-females either produce the mixture of L- and LL-gametes or L-genomes duplicate in some eggs after fertilization.

Using the artificial crossings, the amphispermy was shown for LR-males in Zhuravlivskiyi Hydropark HPS. Also, based on the observations, it was supposed the circulation of only L<sup>Y</sup>-genomes in the system. The features of selection were suggested.

In the HPS of Tymchenky, the triploids of only one (LLR) genotype was shown, and the scheme of reproduction and selection was suggested. The substantial amount of gametogenesis ways known for hybrid forms inhabiting this HPS allows suggesting the substantial amount of selection variants among their progeny.

The scientific novelty of the work consists of studying of HPS composition in new localities in Ukraine, not having covered by special research on hemiclinal population systems before, including the protected areas. The wider than expected distribution of triploid *P. esculentus* in Ukraine was shown. For the first time, the composition, genetic diversity and dynamics of the unique R-Epf HPS in lower Siverskyi Donets stretches was studied. For the first time, the long-term dynamics of composition and morphological and cytological estimators of a few HPS from Siverskyi Donets diversity center of water frogs diversity was summarized. The reproduction, selection and genomes diversity was studied for the set of model HPS. The morphological differences of early development were found for different *P. esculentus* forms; also, their morphological and phenological anomalies of reproduction and development was found. A new intravital technique for artificial crossing of frogs was developed and tested.

The practical value of the work's results consists of widening the data on the diversity of the European water frog complex in Ukraine, particularly of unique and exclusively complicated systems. The data, obtained on the comparatively rich Ukrainian material, allow to deepen our knowledge about the evolution of hybridogenetic species complexes on the molecular and population levels.

**Keywords:** water frogs, tadpoles, hybrids, ontogenesis, developmental stages, selection, elimination, reproduction, gametogenesis, population system composition, microsatellite analysis, artificial crossings, genomes