

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ФЕДОРОВА АННА ОЛЕГІВНА

УДК: (575+576+577):597.8

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗШИРЕННЯ ПІДХОДІВ ДО ВСТАНОВЛЕННЯ СКЛАДУ
ПРИРОДНИХ ГЕМІКЛОНАЛЬНИХ ПОПУЛЯЦІЙНИХ СИСТЕМ
ГІБРИДОГЕННОГО *PELORHYLAX ESCULENTUS* COMPLEX**

Спеціальність 091 – Біологія

(09 – Біологія)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. О. Федорова

Науковий керівник – Шабанов Дмитро Андрійович, доктор біологічних наук,
професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Федорова А. О. Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена розробці нових та аналізу ефективності вже існуючих методів вивчення зелених жаб роду *Pelophylax*, та їх застосування для визначення складу та механізмів відтворення зелених жаб у геміклональних популяційних системах.

Зелені жаби *Pelophylax esculentus* complex складається з гібрида *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) та двох батьківських видів: *P. lessonae* (Camerano, 1882), генотип LL, та *P. ridibundus* (Pallas, 1771), генотип RR. Гібриди *P. esculentus* відтворюються гібридогенезом (геміклонально), існують як в диплоїдній (LR), так і триплоїдній (LLR або LRR) формах, та в типовому випадку проживають в синтопії з одним або обома батьківськими видами в так званих геміклональних популяційних системах (ГПС).

Різні ГПС можуть відрізнятися за своїм складом, наявністю та відсутністю тих чи інших генотипів. На підтримання складу різних ГПС впливає комплекс факторів: передача різних батьківських геномів в гаметах гібридів та різна частка різних геномів у випадку амфігаметних гібридів, вибіркова смертність одних форм в потомстві та виживання інших, тощо. Для дослідження складних механізмів відтворення та підтримання складу різноманітних типів ГПС необхідно визначати генотипи особин, які входять до складу ГПС, типи гамет які вони передають, тощо. Це вимагає наявності великої кількості методів (від класичних морфологічних досліджень до більш специфічних цитогенетичних, молекулярних та етологічних) та постійної модифікації і розробки нових.

Загалом в дисертаційній роботі було використано та проаналізовано більше 15 різних методів на загальній вибірці у більше ніж 1200 представників роду *Pelophylax*, основна частина яких представлена батьківськими видами *P. ridibundus* (генотип RR), *P. lessonae* (генотип LL) та їх міжвидовим гібридом *P. esculentus* (генотипи LR, LLR та LRR). Таксономічну приналежність аналізованих особин визначали за допомогою комбінації методів в залежності від віку чи стадії особин: аналіз морфологічних ознак (тільки для дорослих та частини метаморфів), каріоаналізу з подальшою флуоресцентною гібридизацією *in situ*, аналізу мікросателітних маркерів та SNP гену *uqcrfs1*. Визначення статі проводили за зовнішніми морфологічними ознаками (для дорослих) або за морфологією гонад після розтину (для пуголовків та метаморфів). Плоїдність визначали методами цитометрії еритроцитів (тільки для дорослих жаб), каріоаналізом з подальшим срібленням каріопрепаратів або флуоресцентною гібридизацією *in situ*, аналізом мікросателітних маркерів, проточною ДНК-цитометрією та аналізом SNP гену *uqcrfs1*. Визначення геномів, що передаються в ооцитах самиць проводилось за допомогою аналізу алозимів ЛДГ-1. Для отримання сперми та ікри від жаб для подальшого схрещування проводили гормональну стимуляцію. Крики вивільнення стимулювали штучно в лабораторних умовах, робили аудіозаписи, які потім очищували від шуму та аналізували частотні і темпоральні характеристики кожного окремого крику. Наявність та визначення типу аномалій розвитку проводили візуально, за класифікаціями запропонованими Некрасовою О. Д. (Некрасова, 2008), Meteyer С. (Meteyer, 2000) та Катрушенко С. (Катрушенко, 2020). В статистичному аналізі були використані описові статистики, дисперсійний аналіз, критерій Краскела-Воліса, кореляційний аналіз, дискримінантний аналіз, аналіз головних компонент.

Дослідження проводились на вибірках зелених жаб, які здебільшого склалися із власних зборів, або зборів, що проводилися під час щорічних моніторингів декількох ГПС разом з колективом лабораторії популяційної екології амфібій, кафедри зоології та екології тварин, біологічного факультету,

Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, в якій дисертантка проводила основну частину дисертаційного дослідження. Частина матеріалу, що використовувався для біоакустичного аналізу та аналізу геномів в ооцитах самиць зелених жаб, надані Лукасом Холевою, Марією Долежалковою-Каштанковою та Веронікою Лабаєвою (Інститут фізіології та генетики тварин, Чеська республіка) та Василю Струс (Львівський національний університет імені Франка, Україна).

В ході роботи ми розробили і впровадили новий протокол прижиттєвого отримання хромосомних препаратів від пуголовків за рахунок використання їх здатності до швидкої регенерації на ранніх етапах розвитку; а також перевірили ефективність використання наступних методів: біоакустичний аналіз криків вивільнення, аналіз аномалій розвитку, цитометрія еритроцитів, цитометрія сперматозоїдів.

Біоакустичний аналіз криків вивільнення п'яти видів роду *Pelophylax* та трьох міжвидових гібридів показав, що крики вивільнення самців чітко розділяються на групи *ridibundus* та *lessonae*, а крики вивільнення гібридів носять проміжний характер. Всередині ліній також спостерігається відмінність між криками вивільнення представників різних видів. В той же час для самиць подібна картина не є характерною: крики вивільнення більшості проаналізованих самиць змішуються в одну групу. Також крики вивільнення триплоїдних гібридів не відрізняються від криків вивільнення диплоїдних гібридів. Таким чином, даний біоакустичний аналіз криків вивільнення не може використовуватися в якості надійного методу ідентифікації таксономічної приналежності або плоїдності зелених жаб.

За результатом оцінки аномалій розвитку не було знайдено різниці в частоті трапляння аномалій у *P. ridibundus* та *P. esculentus*. Також не спостерігалось різниці між диплоїдними та триплоїдними гібридами, між самцями і самицями. Однак, значуща різниця в частоті аномалій кінцівок була знайдена між молодими особинами, що тільки пройшли метаморфоз та вибіркою дорослих особин.

Встановлено, що вимірювання розмірів еритроцитів або їх ядер не є надійним методом визначення плоїдності конкретних особин, оскільки в деяких ГПС зустрічаються триплоїди, чиї клітини та ядра мають розмір в діапазоні характерному для диплоїдних клітин та ядер. Однак, даний метод є ефективним для загальної детекції наявності триплоїдів в ГПС.

Аналіз розмірного розподілу сперматозоїдів диплоїдних та триплоїдних гібридів *P. esculentus* показав, що розмір сперматозоїдів міжвидових геміклональних гібридів відрізняється в кожній окремій особини і вимірювання розмірів сперматозоїдів не може бути надійним методом для ідентифікації самців, що потенційно продукують диплоїдні гамети.

Ми використали комбінацію морфологічних, молекулярних, цитогенетичних та гібридологічного методу для комплексного аналізу складу та характеру відтворення в R-E-Ep-ГПС та R-Epf-ГПС.

В двох різних R-E-Ep-ГПС (ГПС Іськова та Нижнього Добрицького ставу, Харківська область), які складаються з представників батьківського виду *P. ridibundus* та диплоїдних і триплоїдних гібридів *P. esculentus*, аналізуючи мікросателітні локуси, ми визначали мультилокусні генотипи (МЛГ, набір ідентичних алелів в мікросателітних локусах) для ідентифікації клональних ліній L та R геномів гібридів. Ми зафіксували п'ять МЛГ характерних для 4-21 особини серед L геномів (отримані від батьківського виду *P. lessonae*), що свідчило про високий рівень клональності L геномів у гібридів. В той час як майже всі МЛГ R геномів (отримані від батьківського виду *P. ridibundus*) були унікальні. Лише один МЛГ серед R геномів був характерний для двох особин одночасно. Алельне різноманіття R геномів було в п'ять разів вищим за алельне різноманіття L геномів. Також в обох ГПС було зафіксовано суттєву частку пуголовків або метаморфів з генотипом RR, в той час як частка RR серед дорослих була значно нижчою. Можна припустити, що ці молоді особини RR є результатом схрещування між гібридами, завдяки чому вони отримують два клональних R геноми, що призводить до їх ранньої смертності до того, як вони досягнуть статевої зрілості. Однак високе

різноманіття R генотипів вказує на те, що якісь інші причини мають впливати на смертність особин RR. Можливо, значний вплив мають екологічні умови, часте пересушення водойм, що має значний негативний вплив на *P. ridibundus*, які зимують під водою і загалом мають тенденцію проводити більше часу у воді в порівнянні з *P. esculentus*.

Дослідження відтворення в R-Epf-ГПС (заплавне озеро в околицях с. Брусівка, Донецька область) показало, що триплоїдні гібридні самиці з генотипом LLR передають в своїх гаметах генотип L і при схрещуванні з самцями *P. ridibundus* в їх потомстві утворюються диплоїдні та триплоїдні самці і самиці з генотипами LR та LLR. Три з чотирьох форм не спостерігаються серед вибірок дорослих особин, тому ми робимо висновок, що вони гинуть не досягаючи статевої зрілості.

За результатом використання комбінації методів для визначення складу трьох різних ГПС було проведено порівняння та оцінку ефективності кожного методу, використаного в дисертаційному дослідженні. Використання морфологічного аналізу для визначення таксономічної приналежності зелених жаб є ефективним для дорослих особин і підтверджується молекулярними та цитогенетичними методами. Однак, морфологічний аналіз навіть в комбінації з цитометрією еритроцитів не дозволяє точно визначити частки диплоїдів та триплоїдів в ГПС, тому потребує комбінації з молекулярними або цитогенетичними методами. На прикладі двох досліджуваних R-E-Epf-ГПС (ГПС Іськова та Нижнього Добрицького ставу, Харківська область) показано, що частки різних форм жаб відрізняються між різними віковими групами. Для комплексного розуміння складу і характеру відтворення ГПС, в тому числі того, які форми утворюються, які гинуть, а які доживають до статевої зрілості і в подальшому приймають участь розмноженні і передачі генотипів потомству, необхідно аналізувати склад не тільки дорослих особин, а й пуголовків та ювенільних особин на різних стадіях розвитку. На прикладі R-Epf-ГПС (заплавне озеро в околицях с. Брусівка, Донецька область) ми показали, що для аналізу того, який вклад в популяційну систему вносять окремі особини,

ефективним є проведення лабораторних схрещувань і аналіз складу отриманого потомства.

Наукова новизна роботи полягає в створенні нових підходів до дослідження *Pelophylax esculentus* complex та перевірці ефективності вже визнаних методик. А саме, було розроблено новий протокол прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків, який дозволяє залишати тварин живими. Також було оцінено ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення, цитометрії еритроцитів та цитометрії сперматозоїдів для визначення таксономічної приналежності та/або плоїдності особин та їх гамет. Комбінація морфологічних, цитометричних, молекулярних, цитогенетичних та гібридологічних методів була успішно використана для дослідження особливостей гаметогенезу, відтворення та смертності зелених жаб з декількох типів ГПС. Отримані результати показали ефективність використання комбінації різних методів для цілісної оцінки механізмів, завдяки яким різноманітні ГПС підтримують свою стабільність.

Практична цінність роботи полягає в тому, що вона дає нові підстави для вибору комплексу методів для вивчення практично та теоретично цікавої групи тварин. Зелені жаби є важливим компонентом біогеоценозів, регулюють чисельність багатьох груп безхребетних та слугують харчовим ресурсом для низки видів хребетних та (особливо пуголовки) безхребетних (Шабанов, 2014). На відтворення зелених жаб суттєвий вплив мають генетичні процеси, що відбуваються у їхніх ГПС та пов'язані з гібридизацією, геміклональним спадкуванням та нежиттєздатністю потомства з низкою геномних композицій. Керування стійкістю біогеоценозів потребує розуміння процесів, що відбуваються в ГПС зелених жаб, і, таким чином, визначення складу цих ГПС.

Новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання під час вивчення інших гібридогенних та диплоїдно-поліплоїдних комплексів амфібій.

Вивчення механізму геміклонального спадкування у гібридних зелених жаб важливе для розуміння можливостей керування передачею спадкового

матеріалу з покоління у покоління та вибіркового видалення окремих частин геному. Для досліджень цього феномену важливе визначення складу природних ГПС, яке вдосконалюється у нашій роботі.

Ключові слова: амфібії, зелені жаби, біоакустика, аномалії, цитогенетика, *Pelophylax*, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax lessonae*, *Pelophylax esculentus*, гібрид, триплоїд, диплоїд, геміклональна популяційна система.

ANNOTATION

Fedorova A. O. Expansion of approaches to establishing the composition of natural hemiclinal population systems of hybridogenic *Pelophylax esculentus* complex. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 – "Biology". V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2023.

The dissertation is devoted to developing new methods and analyzing the effectiveness of already existing methods for studying water frogs of the genus *Pelophylax*, and using these methods to determine the composition and mechanisms of reproduction of water frogs in hemiclinal population systems.

In total, more than 14 different methods were used to analyze more than 1,200 frogs of the genus *Pelophylax*. Most of frogs were parental species *P. ridibundus* (genotype RR), *P. lessonae* (genotype LL), and their interspecies hybrid *P. esculentus* (genotypes LR, LLR and LRR). The taxonomy of the analyzed individuals was determined using a combination of methods depending on the age or stage of the individuals: analysis of morphological features (only for adults and some froglets), karyoanalysis followed by fluorescent *in situ* hybridization, analysis of microsatellite markers and SNPs of the *uqcrfs1* gene. Sex was determined by external morphological features (for adults) or by the gonadal morphology after dissection (for tadpoles and froglets). Ploidy was determined by erythrocyte cytometry (only for adult frogs), karyoanalysis followed by Ag-staining of or fluorescent *in situ* hybridization, analysis of microsatellite markers, DNA flow cytometry, and SNP analysis of the *uqcrfs1* gene. Genomes transmitted in oocytes of females were determined using LDH-1 allozyme analysis. Hormonal stimulation was performed to obtain sperm and eggs from frogs for further crossing. Release calls were stimulated artificially in laboratory conditions and recorded; audio recordings were then cleaned of noise and the frequency and temporal parameters of each individual call were analyzed. The presence and identification of developmental anomalies was carried out visually, according to the classifications

proposed by Nekrasova O.D. (Nekrasova, 2008), Meteyer S. (Meteyer, 2000) and Katrushenko S. (Katrushenko, 2020). In statistical analysis we used descriptive statistics, variance analysis, Kruskal-Wallis test, correlation analysis, discriminant analysis, and principal component analysis.

The research was conducted on the samples of water frogs, which mostly consist of own collections, or collections made during annual monitoring of several HPS together with the colleagues from the Laboratory of Amphibian Population Ecology, Department of Zoology and Animal Ecology, Faculty of Biology, V. N. Karazin Kharkiv National University, in which the PhD student conducted the main part of the dissertation research. Part of the material used for bioacoustic analysis and analysis of genome in oocytes of female water frogs was provided by Lukas Choleva, Maria Dolezalkova-Kastankova and Veronika Labajova (Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Republic) and Vasylyna Strus (Ivan Franko National University, Ukraine).

In this work, we developed and implemented a new protocol for obtaining mitotic chromosomes from tadpoles by using their ability to rapidly regenerate in the early stages of development; and also analyzed the effectiveness of the following methods: bioacoustic analysis of release calls, analysis of developmental anomalies, erythrocyte cytometry, sperm cytometry.

Bioacoustic analysis of release calls of five *Pelophylax* species and three interspecies hybrids showed that male release calls are divided into “*ridibundus*” and “*lessonae*” lineages, while hybrids’ calls have intermediate features. Within the lineages release calls of different species are also distinguished. However, the same pattern was not found for females: most of female release calls are mixed in one group. Also, release calls of triploid hybrids did not differ from diploid. Therefore, release calls cannot be used as a reliable method for species or ploidy identification of water frogs.

As a result of the analysis of developmental anomalies, no difference was found in the frequency of anomalies between *P. ridibundus* and *P. esculentus*. Also, no difference was observed between diploid and triploid hybrids. However, a

significant difference in the frequency of limb malformations was found between the newly metamorphosed juveniles and the adult individuals.

It has been established that measuring the size of erythrocytes or their nuclei is not a reliable method for determining the ploidy of specific individuals, since triploids with cells and nuclei size in the range typical of diploid cells and nuclei are found in some HPS. However, this method is effective for the general detection of the presence of triploids in HPS.

Analysis of sperm size distribution of diploid and triploid *P. esculentus* hybrids showed that spermatogenesis of interspecies hemiclinal hybrids has many degrees of freedom and measurement of sperm size cannot be a reliable method for identification of males potentially producing diploid gametes.

We used a combination of morphological, molecular, cytogenetic and hybridological methods to comprehensively analyze the composition and pattern of reproduction in R-E-Ep-HPS and R-Epf-HPS.

In two different R-E-Ep-HPS (HPS of Iskiv pond and Lower Dobrytskyi pond, Kharkiv region), consisting of parental species *P. ridibundus* and diploid and triploid hybrids *P. esculentus*, by analyzing microsatellite loci, we determined multilocus genotypes (MLG, a set of identical alleles at microsatellite loci) to identify clonal lines of L and R genomes of the hybrids. We identified five MLGs among the L genomes (derived from the parental species *P. lessonae*) shared within 4-21 individuals, which indicated a high level of clonality of L genomes in hybrids. While almost all MLG of R genomes (genomes of the parental species *P. ridibundus*) were unique. Only one MLG of R genomes was shared between two individuals. The allelic diversity of R genomes was five times higher than the allelic diversity of L genomes. A substantial proportion of tadpoles or froglets with the RR genotype was also recorded, while the proportion of RR among adults was much lower. It can be hypothesized that these RR juveniles are the result of a cross between hybrids, whereby they receive two clonal R genomes, leading to their early mortality before they reach sexual maturity. However, the high diversity of R genomes indicates that some other cause must be influencing the mortality of RR individuals.

Environmental conditions may have a significant influence, such as frequent drying of water bodies that has a significant negative effect on *P. ridibundus*, which overwinter underwater and generally tend to spend more time in water compared to *P. esculentus*.

The study of reproduction in R-Epf-HPS (floodplain lake in the vicinity of village Brusivka, Donetsk region) showed that triploid hybrid females with the LLR genotype transmit the L gene in their gametes, and when crossed with *P. ridibundus* males, diploid and triploid males and females with LR and LLR genotypes are formed in their offspring. Three of the four forms are not observed among samples of adults, so we conclude that they die before reaching sexual maturity.

Based on the results of using a combination of methods to determine the composition of three different HPS, we compared and evaluated of the effectiveness of each method used. Using morphological analysis to determine the taxonomy of water frogs is effective for adults and is confirmed by molecular and cytogenetic methods. However, morphological analysis, even in combination with cytometry of erythrocytes, does not allow accurate determination of the proportion of diploids and triploids in HPS, therefore, it requires to be combined with molecular or cytogenetic methods. On the example of two analyzed R-E-Ep-HPS (HPS of Iskiv pond and Lower Dobrytskyi pond, Kharkiv region) it is shown that the proportions of different forms of frogs differ between different age groups. For a comprehensive understanding of the composition and nature of the reproduction within HPS, including which forms are formed, which die, and which survive to sexual maturity and subsequently take part in reproduction and the transmission of genomes to offspring, it is necessary to analyze the composition of not only adults, but also tadpoles and juveniles at different stages of development. Using the example of R-Epf-HPS (a floodplain lake in the vicinity of the village Brusivka, Donetsk region), we showed that to analyze the contribution of individual frogs to the population system, it is effective to carry out laboratory crossings and analyze the composition of the obtained offspring.

The scientific novelty of this work consists in creating new approaches for studying *Pelophylax esculentus* complex and evaluating the effectiveness of already recognized methods. A new protocol for intravital determination of tadpole ploidy was developed, which allows to keep animals alive and intact. The efficiency of using the bioacoustic criterion, erythrocyte cytometry and sperm cytometry to determine the taxonomic affiliation and/or ploidy of individuals and their gametes was also evaluated. The above-mentioned methods in combination with classical molecular and cytogenetic methods have been successfully used to study the features of gametogenesis, reproduction and mortality of water frogs from several types of HPS. The obtained results showed the effectiveness of using a combination of different methods for a holistic assessment of the mechanisms by which various HPSs maintain their stability.

The practical value of the work is that it provides new opportunities for studying a practically and theoretically interesting group of animals. Water frogs are an important component of biogeocenoses, regulate the abundance of many groups of invertebrates and serve as a resource for a number of species of vertebrates and (especially tadpoles) invertebrates. The reproduction of water frogs is significantly influenced by the genetic processes that occur in their HPS and are associated with hybridization, hemiclinal inheritance, and non-viability of offspring with a number of genomic compositions. Managing the stability of biogeocenoses requires understanding the processes occurring in the water frogs' HPS and, thus, determining the composition of these HPS.

The new method of *intravital obtaining mitotic* of tadpoles can be adapted for use in the study of other hybridogenic and diploid-polyploid complexes of amphibians.

Studying the mechanism of hemiclinal inheritance in hybrid water frogs is important for understanding the possibilities of controlling the transfer of genetic material from generation to generation and selective deletion of individual parts of the genome. For studies of this phenomenon, the definition of the composition of natural HPS, which is being improved in our work, is important.

Keywords: amphibians, water frogs, bioacoustics, anomalies, cytogenetics, *Pelophylax*, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax lessonae*, *Pelophylax esculentus*, hybrid, triploid, diploid, hemiclonal population system.

Список публікацій здобувачки, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

У виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of science:

1. **Fedorova A.**, Pustovalova E., Drohvalenko M. (2023) High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetological Bulletin*. 164, 24-25. <https://doi.org/10.33256/hb164.2425> (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, визначення аномалій, аналіз отриманих даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
2. **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Differences in release calls of the hybrid water frog *Pelophylax esculentus* and its parental species *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) in Ukraine. *Biologia*. 78(3): 1-8. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, запис співів жаб, аналіз аудіозаписів, статистичний аналіз, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
3. Drohvalenko M., **Fedorova A.** (2022) The first evidence of triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone. *Bonn Zoological Bulletin*. 71(2): 105-108. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, аналіз пліодності, підготовка ілюстрацій для статті)
4. Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue of tadpoles' tail tips. *Journal of Vertebrate Biology*, 71(22010): 1-7. (особистий внесок: проведення лабораторних досліджень, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)

У виданнях, які включені до переліку наукових фахових видань України:

1. **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Genomes diversity in oocytes of hybrid water frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in hemiclinal population systems from Ukraine. *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 24(1): 25-29. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, проведення лабораторних досліджень, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
2. **Fedorova A.**, Pustovalova E. (2021) What the distribution of sperm size can tell about the stability of spermatogenesis in hybrid frogs *Pelophylax esculentus*. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 37(2): 70-78. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, проведення лабораторних досліджень з отримання сперми і вимірювання розмірів клітин, статистичний аналіз, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
3. Drohvalenko M., Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. (2021) First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh river basin (Kharkiv region, Ukraine). *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 23 (2): 61-67. (особистий внесок: аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, редагування окремих частин статті)

Наукові публікації, що додатково відображають результати дослідження:

1. Kryvoltsevych A., **Fedorova A.**, Shabanov D., Pustovalova E. (2022) Anomalies in Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) and hybrid waterfrogs (*P. esculentus*) (Anura: Ranidae) from two ponds in the Kharkiv Region of Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 29(1): 204-209. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання окремих частин статті)
2. Drohvalenko M., **Fedorova A.**, Pustovalova E. (2022) Unexpected Heterochrony in the Edible Frog, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus 1758), and

Pallas' Spadefoot, *Pelobates vespertinus* (Pallas 1771), in Eastern Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 29: 472-474. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, підготовка ілюстрацій для статті)

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації

1. Fedorova A. Diversity of frog release calls in the genus *Pelophylax*. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (смт Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).
2. Drohvalenko, M. O., Fedorova A. O., Pustovalova E. S., Mikulíček P. Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclonal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (смт Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).
3. Shabanov V., Kryvoltsevych A., Zhadan A., Podpryatov O., **Fedorova A.**, Drohvalenko M., Pustovalova E. Monitoring of the state of HPS of water frogs located in Lower Dobrytskyi pond. *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2021, Shatsk, Ukraine)*
4. **Fedorova A.** Repeat study on ploidy of tadpoles from lower Dobrytskyi pond. *SymBioSE-2019 (July 29 – August 6, Glasgow, Scotland)*
5. **Fedorova A.**, Pustovalova E. Results of artificial crossing expand data about reproduction and composition of unusual population system (*Pelophylax esculentus* complex). *Open Readings. 62nd International conference for students of physics and natural sciences. (March 19-22, 2019, Vilnius, Lithuania)*
6. Pustovalova E., **Fedorova A.**, Pereslavskaya K., Verchoturova P. Hemiclonal population system of water frogs in Lower Dobrytskyi pond: results of annual

- monitoring. *14th International young scientists' conference "Biology: From a Molecule Up to The Biosphere"* (November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine)
7. Drohvalenko M., **Fedorova A.**, Pustovalova E. *Pelophylax esculentus* complex from Iskiv pond: one more step of long-term monitoring. "Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas". *International Zoological Conference. (September 12-15, 2019, Lviv, Shatsk, Ukraine)*
 8. **Fedorova A. O.**, Drohvalenko M. O., Pustovalova E. S. Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond. *Abstract book of the Conference of young zoologists (November 14-15, 2018, Kyiv, Ukraine)*
 9. Kravchenko M., Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. Hemiclonal inheritance of water frogs: occasional incident, transition state or the natural stage of development? *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)*
 10. Biliaiev I., Bondarenko H., Harbuz D., Drohvalenko M., Siervatovska Y., Sudarenko U., Teplenko U., **Fedorova A.**, Shabanov D. Composition and changes of three hemiclonal population systems of water frogs from NNP "Gomilshanski lisy". *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)*
 11. Drohvalenko M. O., Kravchenko M. O., Makarian R. M, Stepanyuk Ya. V. **Fedorova A. O.**, Shabanov D.A. Selective genetic and environmental mortality of different representatives of water frogs' hybridogenic complex provides the stability of their hemiclonal population systems. Regional aspects of floristic and faunistic research. *Fifth international scientific and practical conference (April 19-20, 2018, Chernivtsi, Ukraine)*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ANNOTATION	9
Список публікацій здобувачки, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.....	15
ЗМІСТ	19
Перелік умовних позначень	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. Гібридогенез та геміклональне спадкування зелених жаб.....	31
1.2. Методологічні підходи до вивчення різноманіття зелених жаб	36
1.3.1. Визначення таксономічної приналежності та статі за морфологічними ознаками.....	36
1.3.2. Цитометрія еритроцитів для визначення плоідності.....	37
1.3.3. Аналіз каріотипу	39
1.3.4. Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i> (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization, FISH).....	40
1.3.5. Молекулярні методи	40
1.3.6. Визначення геномів в гаметах	43
1.3.7. Використання біоакустичних методів в таксономії безхвостих амфібій	44
1.3.8. Аномалії розвитку зелених жаб.....	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	48
2.1. Збір вибірок зелених жаб.....	48

2.2.	Визначення таксономічної приналежності за морфологічними ознаками	50
2.3.	Визначення статі.....	52
2.4.	Цитометричні та цитогенетичні методи	53
2.4.1.	Цитометрія еритроцитів	53
2.4.2.	Каріоаналіз метафазних хромосом.....	54
2.4.3.	Сріблення	55
2.4.4.	Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i> (FISH)	56
2.5.	Визначення генотипів гамет самиць (аналіз алозимів LDH-1).....	57
2.6.	Молекулярний аналіз	58
2.6.1.	Збір і зберігання зразків.....	58
2.6.2.	Виділення ДНК.....	58
2.6.3.	ПЛР-ампліфікація мікросателітних послідовностей.....	58
2.6.4.	ПЛР-ампліфікація та секвенування гену <i>uqcrfs1</i>	59
2.6.5.	Проточна ДНК-цитометрія	60
2.7.	Гормональна стимуляція самців і взяття зразків сперми	60
2.8.	Методика штучних схрещувань.....	62
2.9.	Біоакустичні методи.....	63
2.10.	Визначення зовнішніх морфологічних аномалій.....	64
2.11.	Статистичний аналіз.....	64
РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТАКСОНОМІЧНОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ, ПЛОЇДНОСТІ ТА ГЕНОМНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ.....		65
3.1.	Нові підходи до визначення зелених жаб за біоакустичним аналізом	65

3.1.1.	Крики вивільнення зелених жаб роду <i>Pelophylax</i>	65
3.1.2.	Крики вивільнення <i>P. esculentus</i> і <i>P. ridibundus</i> Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.....	69
3.2.	Новий метод прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків	78
3.3.	Порівняння різних форм зелених жаб за стійкістю їх розвитку (аномалії розвитку)	84
3.4.	Розмір еритроцитів для оцінки плоїдності	92
3.4.1.	Ефективність вимірювання розмірів еритроцитів для визначення плоїдності гібридів.....	92
3.4.2.	Використання цитометрії еритроцитів для фіксування наявності триплоїдів в ГПС	96
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ГАМЕТОГЕНЕЗУ РІЗНИХ ФОРМ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ.....		100
4.1.	Аналіз розмірного розподілу сперматозоїдів та визначення плоїдності сперми за розміром сперматозоїдів.....	100
4.2.	Різнманіття геномів, що передаються в різних ГПС	107
РОЗДІЛ 5. ВИКОРИСТАННЯ ЗАПРОПОНОВАНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ВІДТВОРЕННЯ ГІБРИДІВ В ПРИРОДНИХ ГПС		111
5.1.	Відтворення гібридів в ГПС Іськова ставу	111
5.1.1.	Визначення складу ГПС в Іському ставі	111
5.1.2.	Визначення клональних ліній за допомогою аналізу мультилокусних генотипів (МЛГ).....	112
5.2.	Відтворення триплоїдних гібридів в R-Erf-ГПС	122
5.3.	Смертність пуголовків в R-E-Eр ГПС Нижнього Добрицького ставу	

5.3.1. Визначення складу дорослих особин і пуголовків ГПС Нижнього Добрицького ставу	128
5.3.2. Клональні лінії пуголовків	130
5.4. Оцінка ефективності методів аналізу ГПС, використаних в дисертаційному дослідженні.....	133
ВИСНОВКИ.....	139
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	142
ДОДАТКИ.....	171

Перелік умовних позначень

ГПС – геміклональна популяційна система

R-E-ГПС – геміклональна популяційна система, що складається з представників *P. ridibundus* та *P. esculentus*

L-E-ГПС – геміклональна популяційна система, що складається з представників *P. lessonae* та *P. esculentus*

L-E-R – геміклональна популяційна система, що складається з представників *P. lessonae*, *P. esculentus* та *P. ridibundus*

L геном – геном батьківського виду *P. lessonae*

R геном – геном батьківського виду *P. ridibundus*

MLG, МЛГ – multilocus genotype, мультилокусний генотип

SVL – snout-ventral length, довжина тіла, виміряна від кінчика морди до заднього кінця клоаки.

ВСТУП

Актуальність теми. Гібридогенез це форма нестатевого розмноження, відома у деяких безхребетних, риб і земноводних. У порівнянні з більш поширеним апоміктичним партеногенезом, під час якого всі хромосоми матері успадковуються клонально, гібридогенні організми клонально передають лише один батьківський геном наступному поколінню. Тому такий спосіб спадкування також називають геміклональним.

Зелені жаби *Pelophylax esculentus* complex є одним прикладом гібридогенних тварин, які вивчаються найбільш активно. Цей комплекс складається з геміклонального гібрида *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) та двох батьківських видів: *P. lessonae* (Camerano, 1882), генотип LL, та *P. ridibundus* (Pallas, 1771), генотип RR. Гібриди існують як в диплоїдній (LR), так і триплоїдній (LLR або LRR) формах (Christiansen, 2005; Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009; G. & Hertwig, 1920; Ogielska et al., 2004; Ogielska-Nowak, 1978; Plötner, 2005). У типовому випадку під час гаметогенезу диплоїдні гібриди елімінують один із батьківських геномів із статевих клітин і подвоюють решту хромосом перед мейозом (Heppich et al., 1982; Tunner & Heppich, 1981; Tunner & Heppich-Tunner, 1991). Оскільки в мейоз вступають два ідентичних набори хромосом, у результаті мейотичного поділу утворюються гамети з клональним (L) або (R) геномом (дужки позначають клональний геном). Гібриди також можуть виникати від первинного схрещування батьківських видів у симпатричних популяціях, але такі випадки не є широко поширеними (Berger, 1968; Dufresnes & Mazepa, 2020; Polls Pelaz, 1994). Найчастіше нове гібридне покоління виникає в результаті схрещування гібридів (передають клональні геноми) і одного з батьківських видів (передають статеві геноми). Системи, в яких клональний і статевий геноми циркулюють одночасно, називаються геміклональними популяційними системами (ГПС) (Shabanov et al., 2020).

Різні ГПС можуть відрізнятися за своїм складом, наявністю та відсутністю тих чи інших генотипів. На підтримання складу різних ГПС впливає комплекс факторів: передача різних батьківських геномів в гаметах гібридів та різна частка різних геномів у випадку амфігаметних гібридів, вибіркова смертність одних форм в потомстві та виживання інших, тощо. Для

Дослідження складних механізмів відтворення та підтримання складу різноманітних типів ГПС вимагає наявності великої кількості методологічних підходів (від класичних морфологічних досліджень до більш специфічних цитогенетичних, молекулярних та етологічних) та постійної модифікації і розробки нових.

Об'єкт досліджень. Об'єктом досліджень є методи дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*.

Предмет досліджень. Предметом досліджень є різноманіття та оцінка ефективності методів дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*, в тому числі цитологічних, молекулярних, цитогенетичних та етологічних, а також практичне застосування цих методів.

Мета і завдання роботи. Метою роботи є розширення комплексу методів встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex. Для досягнення даної мети поставлені наступні задачі:

1. Встановити ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення в якості видоспецифічного маркера для жаб роду *Pelophylax*;
2. Розробити та апробувати метод прижиттєвого визначення плоідності пуголовків;
3. Порівняти різні форми зелених жаб за стійкістю їх розвитку (аномалії розвитку);
4. Встановити ефективність використання цитометрії еритроцитів для детекції триплоїдних гібридів в ГПС;

5. Встановити ефективність вимірювання розмірів сперматозоїдів для визначення їх плоідності;
6. Використати комплекс морфологічних, гібридологічного, молекулярних та цитогенетичних методів для дослідження складу, вибіркової смертності, характеру відтворення та різноманіття геномів, що передаються в R-E-Ep-ГПС та R-Epf-ГПС;
7. Порівняти та оцінити ефективність використаних методів і запропонувати комплекс методів і порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС.

Методи дослідження

1. Збирання вибірок *Pelophylax esculentus* complex з природних місцеперебувань;
2. Визначення таксономічної приналежності та статі за морфологічними ознаками;
3. Цитометрія еритроцитів та сперматозоїдів;
4. Цитогенетичні методи (каріоаналіз метафазних хромосом, сріблення хромосомних препаратів, флуоресцентна гібридизація *in situ*);
5. Молекулярні методи (мікросателітний аналіз, аналіз SNP гену *uqcrfs1*);
6. Електрофорез білкових маркерів (алозими ЛДГ-1);
7. Гібридологічний (проведення штучних схрещувань в лабораторних умовах);
8. Біоакустичний аналіз криків вивільнення;
9. Аналіз зовнішніх морфологічних аномалій;
10. Статистичні методи (дисперсійний аналіз, критерій Краскела-Воліса, кореляційний аналіз, дискримінантний аналіз, аналіз головних компонент, тощо).

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі проведено комплексний аналіз та модифікацію деяких вже існуючих методів, а також розробку та апробацію нових методів дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*. Визначено неефективність використання криків вивільнення в

якості видоспецифічного маркера для зелених роду *Pelophylax*. Розроблено новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків, який дозволяє залишати тварин живими. Також було оцінено ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення, цитометрії еритроцитів та цитометрії сперматозоїдів для визначення таксономічної приналежності та/або плідності особин та їх гамет. Комбінація морфологічних, цитометричних, молекулярних, цитогенетичних та гібридологічних методів була успішно використана для дослідження особливостей гаметогенезу, відтворення та смертності зелених жаб з декількох типів ГПС. Отримано нові дані, що стосуються особливостей підтримання складу декількох ГПС за рахунок вибіркової смертності частини потомства.

Отримані результати показали ефективність використання комбінації різних методів для цілісної оцінки механізмів, завдяки яким різноманітні ГПС підтримують свою стабільність.

Особистий внесок здобувачки. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням здобувачки. Здобувачка провела аналіз літературних джерел за темою дисертаційного дослідження, самостійно зібрала та обробила більшу частину описаних матеріалів. Більша частина роботи проведена на базі Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (Харків, Україна). Виділення ДНК, ПЛР та секвенування мікросателітних послідовностей здобувачка здійснила на базі кафедри зоології університету Коменського в Братиславі (Словаччина). Збір та аналіз біоакустичних даних проведені здобувачкою самостійно на базі Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (Харків, Україна) та Інституту фізіології та генетики тварин (Лібехов, Чеська республіка). Здобувачка самостійно провела статистичний аналіз представлений в дисертаційному дослідженні. Написання та оформлення публікацій здійснено здобувачкою самостійно або за безпосередньої її участі.

Публікації. За темою дисертаційного дослідження вийшли друком 6 наукових публікацій у закордонних наукових виданнях, в тому числі 4 статті

в журналах, що індексуються в Scopus та/або Web of Science (один журнал в Q2 і три журнали в Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 3 статті у фахових наукових виданнях України.

Апробація матеріалів дисертації. За результатами дисертаційного дослідження були представлені доповіді та опубліковані тези доповідей на наступних конференціях:

1. Fifth international scientific and practical conference (April 19-20, 2018, Chernivtsi, Ukraine)
2. Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)
3. Conference of young zoologists (November 14-15, 2018, Kyiv, Ukraine)
4. Open Readings. 62nd International conference for students of physics and natural sciences. (March 19-22, 2019, Vilnius, Lithuania)
5. 14th International young scientists' conference "Biology: From a Molecule Up to The Biosphere" (November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine)
6. SymBioSE-2019 (July 29 – August 6, 2019, Glasgow, Scotland)
7. "Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas". International Zoological Conference. (September 12-15, 2019, Lviv, Shatsk, Ukraine)
8. Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2021, Shatsk, Ukraine)
9. Шоста міжнародна науково-практична конференція «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 207 сторінках, складається з анотації, змісту, основної частини, списку використаних джерел (227 посилань) та 10 додатків. Основна частина складається з наступних частин: вступ, огляд літератури (розділ 1), матеріали і методи дослідження (розділ 2), результати та обговорення (розділи 3-5),

висновки, та викладена на 118 сторінках. Текст дисертації містить 32 ілюстрації та 19 таблиць.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Частина роботи пов'язана з мікросателітним та біоакустичним аналізом виконана за підтримки Slovak Academic International Agency (номер гранту 1/0286/19) та Researchers at Risk Fellowship від Чеської Академії Наук (номер гранту RRFU-22-20).

Практичне значення отриманих результатів. Проведений перелік методів дослідження зелених жаб, що вже існують, розробка, модифікація та апробація нових методів дозволяє ефективніше підходити до дослідження різноманіття зелених жаб. Результати отримані в ході використання комплексу запропонованих методів представляють важливе значення для розуміння особливостей гібридогенезу та вибіркової смертності в геміклональних популяційних системах різного складу. Розроблений новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання у інших видів амфібій.

Подяки. Висловлюю подяку своєму науковому керівнику Шабанову Дмитру Андрійовичу та колективу Лабораторії популяційної екології амфібій (Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна) за допомогу і підтримку на всіх етапах роботи над дисертаційним дослідженням. Також висловлюю подяку колективу Лабораторії генетики риб (Інститут фізіології та генетики тварин, Чеська республіка) і Кафедрі зоології університету Коменського в Братиславі (Словаччина), та особисто Лукасу Холеві, Дмитру Дідуху та Петру Мікулічеку за можливість розширити свої дослідження та всебічну підтримку під час повномасштабної війни, яка дозволила мені закінчити роботу над дисертацією. Також я вдячна Денису Вишневському та Сергію Домашевському за допомогу в проведенні досліджень в Чорнобильському радіаційно-екологічному біосферному заповіднику, та всім студентам Каразінського університету, які допомагали зі збором та обробкою матеріалу під час літніх студентських практик на біостанції. Також висловлюю

подяку Юрію Коту за можливість проводити частину досліджень в його лабораторії.

Особливу вдячність хочу висловити Елеонорі Пустоваловій, яка протягом всіх цих років була моєю опорою і підтримкою, і разом з якою ми завжди відшукували світло та натхнення, навіть в найтемніші часи. Також особливу вдячність висловлюю Миколі Дрогваленку за всі наші наукові дискусії, спільні польові пригоди та ефективну співпрацю. А також Павлу Отряжому за підтримку і терпіння протягом всіх років разом, Георгію Бондаренко за мотивацію, наукове натхнення та спільні плани на майбутні дослідження та Єлизаветі Анпілоговій за готовність підтримати, вислухати і бути на моєму боці не дивлячись ні на що. І найважливішу подяку висловлюю Збройним силам України, завдяки зусиллям яких я маю змогу продовжувати свою роботу і жити своє життя.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гібридогенез та геміклональне спадкування зелених жаб

Гібридизація (утворення потомства від схрещування особин різних видів) є доволі розповсюдженою в природі, і кількість нових таксонів гібридного походження постійно зростає завдяки покращенню молекулярних методів (Abbott et al., 2013; Barton, 2001; Chan et al., 2019; Payseur & Rieseberg, 2016).

Однак, як правило, для еукаріотів є характерною наявність відокремлених видових генофондів та гібридна стерильність у міжвидових гібридів з дивергованими каріотипами, що є наслідком нездатності до кон'югації гомологічних хромосом у мейозі (Borodin et al., 2019; Comeault & Matute, 2018; King, 1995; Marta et al., 2023). Відомо три основні шляхи подолання гібридної стерильності. Перший — перехід гібридів до клонального відтворення, наприклад, партеногенезу як у ящірок з роду *Darevskia* (Freitas et al., 2016, 2022). Другий – поліплоїдизація гібридів, наприклад, як у тетраплоїдних видів *Bufo viridis* group (Dufresnes et al., 2014; Stöck et al., 2005, 2010). Третій – перехід до геміклонального відтворення, як у представників *Pelophylax esculentus* complex (Plötner, 2005).

Геміклональне спадкування, або гібридогенез, є способом відтворення, для якого характерна елімінація одного з батьківських геномів в лініях статевих клітин гібридів (що дозволяє запобігти хромосомному конфлікту під час мейозу) і подальша ендореplikація другого геному перед мейозом (Dawley, 1989; Dedukh & Krasikova, 2022; Schultz, 1969). Таким чином утворюються гамети з нерекomboнованим, клональним, геномом. Даний феномен описаний для декількох не пов'язаних між собою таксонів: наприклад, палочників *Bacillus rossius-grandii benazzii* (Mantovani & Scali, 1992), карпів *Hypseleotris* spp (Majtánová et al., 2021; Schmidt et al., 2011), голівнів *Squalius* (Carmona et al., 1997) та живородних риб *Poeciliopsis*

monacha-lucida, на прикладі яких гібридогенез було вперше відкрито (Cimino, 1972; Schultz, 1967, 1969). Також, так званий триплоїдний гібридогенез (елімінація геному, який має одну копію, і подальший мейоз геномів, що представлені двома копіями) характерний для декількох видів риб та зелених ропух роду *Bufo* (Alves et al., 1998; Cimino, 1972; Goddard et al., 1998; Saitoh et al., 2004; Stöck et al., 2012).

Європейські зелені жаби, *Pelophylax esculentus* complex, є одними з найбільш вивчених геміклональних тварин (наприклад, Arioli et al., 2010; Chmielewska et al., 2018; Christiansen, 2005; Christiansen & Reyer, 2009; Dedukh et al., 2013, 2015, 2017, 2020; Doležálková-Kašánková et al., 2018, 2021; Hoffmann et al., 2015; Mikulíček et al., 2015; Mikulíček & Kotlík, 2001; Plötner, 2005; Pruvost et al., 2015; Reyer et al., 2015; Shabanov et al., 2020). Гібридна природа цих жаб була вперше показана Л. Бергером в 1960-1970 роках (Berger, 1964, 1967, 1968, 1970, 1971), а подальші дослідження показали, що вони відтворюються завдяки гібридогенезу (Tunner, 1973).

Іноді гібриди можуть виникати від первинних схрещувань між батьківськими видами в симпатричних популяціях, однак такий спосіб відтворення не є розповсюдженим серед *P. esculentus*. В типовому випадку для реалізації геміклонального спадкування гібриди *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) мають або схрещуватися між собою (з передаванням клональних геномів), або проживати в синтопії з одним або обома батьківськими видами (що передають рекомбінантні геноми): озерною жабою *P. ridibundus* (Pallas, 1771) та ставковою жабою *P. lessonae* (Camerano, 1882). Батьківські геноми зазвичай позначаються буквами R та L, відповідно батьківськи види мають генотипи RR та LL. Гібриди представлені як диплоїдними формами, LR, так і двома варіантами триплоїдних форм, LLR та LRR (Christiansen, 2005; Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009; G. & Hertwig, 1920; Ogielska et al., 2004; Ogielska-Nowak, 1978). Також, в літературі зафіксовані рідкісні випадки утворення тетраплоїдних та

пентаплоїдних гібридів (Hermaniuk et al., 2013; Mikulíček et al., 2015; Шабанов, 2014).

Співіснування *P. esculentus* з батьківськими видами призводить до утворення великого різноманіття популяційних систем з різними частками батьківських видів та різних форм гібридів (наприклад, Arioli et al., 2010; Christiansen & Reyer, 2011; Doležalková-Kašánková et al., 2018; Dufresnes & Mazera, 2020; Hoffmann et al., 2015; Mikulíček et al., 2015; Mikulíček & Kotlík, 2001; Pruvost et al., 2013; Suriadna et al., 2020). Такі системи, де одночасно присутні і клональні, і рекомбінантні гамети, запропоновано називати геміклональними популяційними системами, ГПС (Kravchenko et al., 2018; Shabanov et al., 2020; Шабанов, 2015; Шабанов та ін., 2009).

Гаметогенез *P. esculentus* залежить від складу ГПС, в яких вони проживають (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017; Pustovalova et al., 2022). У випадку невідповідності гаметогенезу гібридів та пулу їх потенційних партнерів відтворення гібридів буде порушеним. Наприклад, у L-E-ГПС (популяційні системи, які складаються з особин *P. lessonae* та *P. esculentus*), що є найбільш поширеними в Європі (Graf & Polls-Pelaz, 1989; Plötner, 2005; Pruvost, Hoffmann & Reyer, 2013; Hoffman et al., 2015), гібриди зазвичай елімінують L-геном (котрий їх потомки отримують від батьківського виду) і передають клонально R-геном (Günther, 1983; Vucci et al., 1990; Pruvost, Hoffmann & Reyer, 2013; Dedukh et al., 2019). Логічним є припущення, що в R-E-ГПС (що більш розповсюджені в Східній Європі), де *P. esculentus* співіснує з *P. ridibundus*, гібриди мають передавати L-геноми для ефективного відтворення. Однак, в таких системах ситуація є більш складною, оскільки диплоїдні гібриди часто продукують суміш гамет з L або R геномами. Цей феномен вперше було показано на самцях *P. esculentus* і названо амфіспермією (Vinogradov et al., 1991). Однак, цей феномен не розповсюджується виключно на самців, а також був зареєстрований у самиць (Dedukh et al., 2015), і тому було запропоновано термін амфігаметність (Pustovalova et al., 2022). Також існують L-E-R-ГПС, в яких гібриди співіснують з обома батьківськими видами

(Herczeg et al., 2017; Hermaniuk et al., 2020; Mikulíček et al., 2015). Триплоїдні гібриди можуть бути присутні в будь-якій з цих трьох типів ГПС (Biriuk et al., 2016; Christiansen & Reyer, 2009), формуючи таким чином L-E-Ep-ГПС or R-E-Ep-ГПС, де «р» означає поліплоїдність (Shabanov et al., 2020). Для різних регіонів розповсюдження *Pelophylax esculentus* complex характерні різні типи ГПС (Arioli et al., 2010; Christiansen & Reyer, 2011; Dufresnes & Mazepa, 2020; Suriadna et al., 2020).

В деяких типах ГПС диплоїдні гібриди успішно співіснують та схрещуються з триплоїдними гібридами, в той час як батьківські форми в таких ГПС відсутні (Chmielewska et al., 2022; Christiansen, 2009; Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009). Такі системи залежать від здатності триплоїдних гібридів продукувати рекомбінантні гамети і здатності диплоїдів продукувати диплоїдні гамети, щоб підтримувати пул триплоїдів (Chmielewska et al., 2022; Christiansen, 2009; Christiansen et al., 2005, 2010; Christiansen & Reyer, 2009).

Стабільність будь-яких типів ГПС підтримується за рахунок декількох внутрішньопопуляційних механізмів. Першим є знижена фертильність деяких форм гібридів, що виникає через порушення гаметогенезу та процесу ембріонального розвитку гонад (Biriuk et al., 2016; Reyer et al., 2003; Szydłowski et al., 2017; Боброва et al., 2014). В тому числі, різноманіття гібридного потомства в кожній конкретній системі залежить від різноманіття гамет, які продукуються гібридами (Biriuk et al., 2016; Chmielewska et al., 2022; Christiansen, 2009; Christiansen & Reyer, 2011; Dedukh et al., 2015; Doležálková et al., 2016; Pustovalova et al., 2022).

Іншим механізмом підтримання стабільності геміклональних популяційних систем є вибіркова смертність серед потомства (Plötner, 2005; Reyer et al., 2015; Drohvalenko et al. 2018). Вважається, що цей ефект спричинений еволюцією клональних геномів та міжгеномними взаємодіями і має на меті стабілізування відтворення ГПС разом з підтриманням найвищої можливої частки гібридів (Reyer et al., 2015). Ймовірно частина потомства

отриманого від схрещування двох гібридів не виживає через накопичення мутацій в клонально передаваних геномах, що може порушувати розвиток через гомозиготність рецесивних шкідливих алелів в конкретних локусах, та / або загальне погіршення від великої кількості мутацій незалежно від гомозиготності (Gueh et al., 2002; Vorburger, 2001). Результатом такої вибіркової смертності є в тому числі існування ГПС, які складаються виключно з гібридів (Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009, 2011). Батьківські види в таких системах утворюються при схрещуванні гібридів, але гинуть на ранніх стадіях розвитку (Reyer et al., 2015).

1.2. Методологічні підходи до вивчення різноманіття зелених жаб

1.3.1. Визначення таксономічної приналежності та статі за морфологічними ознаками

Бергер Л., який першим виявив гібридогенну природу *P. esculentus*, також запропонував морфологічні ознаки, які досі використовуються для визначення таксономічної приналежності жаб *Pelophylax esculentus* complex: зчленування задніх гомілок та форму п'яткового бугра (Berger, 1964, 1969). У *P. esculentus* п'ятковий бугор низький та плаский, а задньогомілкові зчленування заходять одне за одне, оскільки жаби цього виду ведуть здебільшого водний спосіб життя та зимують у воді (Berger & Berger, 1992). З іншого боку, *P. lessonae* зимує переважно на суші, тому має великий округлий бугор для риття ґрунту, а задні кінцівки короткі, що робить їх більш пристосованими для пересування на суші. Гібриди мають проміжні ознаки, для них характерне зимування як на суші, так і у воді (Berger, 1964, 1969; Berger & Berger, 1992; Plötner, 2005). Також для самців характерною ознакою є колір резонаторів, які зазвичай темно-сірі у *P. ridibundus* та білі у *P. lessonae* та *P. esculentus* (Berger, 1964; Микитинець & Сурядна, 2007; Сурядна, 2002; Шабанов, 2014). Стать дорослих особин впевнено визначається за наявністю резонаторів та шлюбних мозолей на передніх лапах у самців.

Визначення таксономічної приналежності та статі за морфологічними ознаками не є можливим для пуголовків та знаходиться під питанням для ювенільних особин, які не пройшли першу гібернацію, оскільки вони ще не мають вторинних статевих ознак і не відрізняються морфологічно (Drohvalenko, 2021; Günther, 1978).

1.3.2. Цитометрія еритроцитів для визначення плоїдності

Розмір є фундаментальною біологічною характеристикою, що впливає на фізіологію на всіх рівнях, від організму до органів, клітин, субклітинних структур та органел. Загальний розмір організму або тканини детермінований розміром і кількістю клітин (Levy & Heald, 2016). Також відомо, що розмір ядра корелює з розміром геному в різноманітних організмів (Gregory, 2001, 2005; Mueller, 2015).

Кількість хромосом та розмір геному змінювались протягом еволюції, підвищуючи диверсифікацію видів (Leggatt & Iwama, 2003). Вважається, що найбільш суттєві зміни є результатом поліплоїдизації (кратного збільшення або всього геному, або наборів хромосом). Поліплоїдність не є поширеною серед птахів та ссавців, але багаторазово виникала під час розвитку та диверсифікації риб та амфібій (Bytyutskyu et al., 2014; Bytyutskyu & Flajšhans, 2014; Leggatt & Iwama, 2003; Stöck et al., 2005).

Збільшення плоїдності призводить до збільшення як загальної кількості ДНК в ядрі, так і кількості копій генів, що може призводити до змін в експресії генів, розмірі ядра, розмірі клітини та може загалом впливати на розмір органів і цілого організму (Fankhauser, 1945; Melaragno et al., 1993; Yu et al., 2010).

Еритроцити амфібій мають ядро і їх розмір варіює в залежності від плоїдності (Bachmann & Nishioka, 1978; Schmeller et al., 2001). Об'єм ядра збільшується пропорційно збільшенню геному в різних груп амфібій (Mitsuru, 1981). Для еукаріотичних клітин характерна кореляція між розміром ядра, розміром клітини та кількістю ДНК, тому збільшення розмірів ядра триплоїдів в порівнянні з диплоїдами також впливає і на розмір всього еритроциту (Niide et al., 2022). Наприклад, еритроцити триплоїдних амфібій роду *Ambistoma* мають в середньому в 1,5 рази більші розміри, ніж еритроцити диплоїдних особин (T. M. Uzzell, 1964).

Метод вимірювання розмірів еритроцитів та/або їх ядер широко використовується для визначення плоідності багатьох хребетних тварин (Cal et al., 2005; Maxime & Labbé, 2010), в тому числі і гібридних *P. esculentus* (Bondarieva et al., 2012; Kierzkowski et al., 2013; Mikulíček & Kotlík, 2001; T. Uzzell & Berger, 1975). Ядро триплоїдних *P. esculentus* приблизно в 1,3 рази більше за ядро диплоїдів, а еритроцити в цілому в 1,5 рази довші (Bondarieva et al., 2012; Ogielska-Nowak, 1978) (Рис. 1.1). Оскільки довжина головної осі еритроцитів триплоїдів збільшується на 23% в порівнянні з диплоїдами, еритроцити триплоїдів зазвичай мають більш еліптичну форму (Bondarieva et al., 2012).

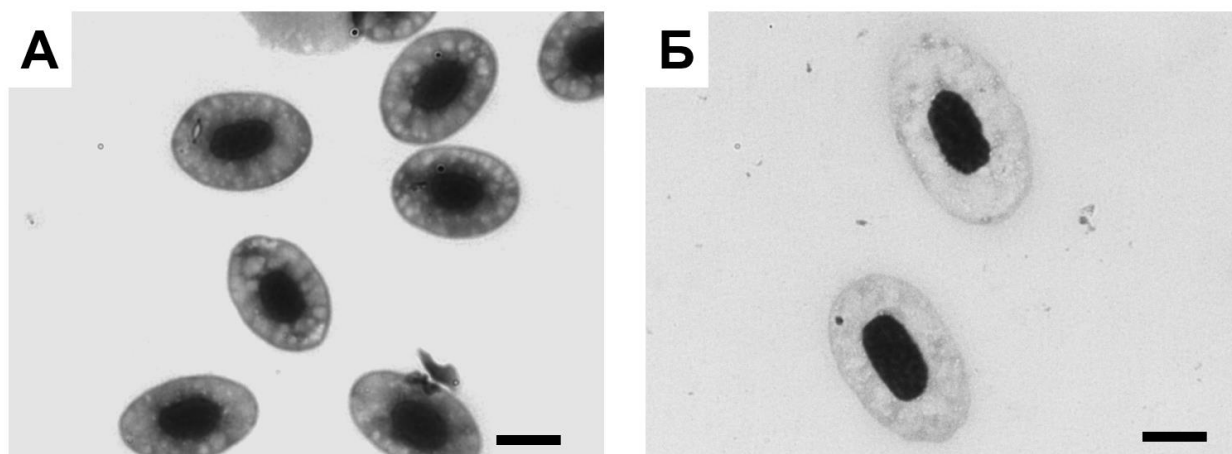


Рис. 1.1. Еритроцити диплоїдного (А) та триплоїдного (Б) гібрида *P. esculentus*. Об'єktiv $\times 100$. Шкала – 10 мкм.

Вимірювання розмірів еритроцитів є швидким і зручним методом для використання у напівпольових умовах або в умовах, коли дороговартісні молекулярні методи не є доступними. Однак, у деяких випадках розмір еритроцитів не відображає вміст ДНК коректно, особливо у молодих особин (Berger et al., 1978; Drohvalenko et al., 2021, 2022; Ogielska et al., 2001; Schmeller et al., 2001; T. Uzzell & Berger, 1975). Більш того, розмір еритроцитів також пов'язаний з рядом інших факторів факторів, як то розмір особини,

географічне розташування, кисневий режим водойми, яку населяють аналізовані особини (Schmeller et al., 2001)

1.3.3. Аналіз каріотипу

Каріотипи *P. lessonae* і *P. ridibundus* складаються з 13 пар хромосом ($2n=26$ хромосом). Відповідно, диплоїдні гібриди *P. esculentus* мають також 26 хромосом, а триплоїдні – 39 хромосом (Heppich, 1978; Koref-Santibacez & Gunther, 1980). Таким чином, простий каріоаналіз навіть без додаткового фарбування препаратів є найбільш точним і наочним методом підтвердження плоїдності гібридів.

Однак, для отримання якісних препаратів необхідно вбивство тварини, що є основним недоліком методу. Найчастіше для каріоаналізу використовується епітелій кишківника (підходить для пуголовків, метаморфів та дорослих жаб), оскільки цієї тканини є багато і її можна довго зберігати у фіксаторі для повторного використання. Також якісні препарати можна отримати з кісткового мозку стегнової кістки (підходить для метаморфів і дорослих жаб), зябер (у пуголовків) і сім'яників (мейотичні хромосоми у дорослих самців) (Biriuk et al., 2016; Pustovalova et al., 2022).

Також сам по собі каріоаналіз не дозволяє визначити конкретну форму триплоїда, LLR чи LRR, або відрізнити гібридів і батьківські види, оскільки батьківські метафазні хромосоми є морфологічно ідентичними: ортологічні хромосоми мають однакову довжину та центромерний індекс (Heppich, 1978; Koref-Santibacez & Gunther, 1980). Більш того, хромосоми батьківських видів не відрізняються за патернами забарвлення фарбником Гімза при використанні методу G-бендінг (Heppich, 1978), який широко використовується для встановлення філогенетичної спорідненості в багатьох інших групах тварин.

1.3.4. Флуоресцентна гібридизація *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

Метод FISH є одним з найбільш надійних методів ідентифікації батьківських хромосом у геномі гібридів. Для ідентифікації геному *P. ridibundus* використовується перичентромерний повтор RrS1, який гібридується з перичентромерними регіонами хромосом 1-5 та 8, але не є характерним для геному *P. lessonae* (Marracci et al., 2011; Ragghianti et al., 1995). Однак, було показано, що даний перичентромерний повтор може варіювати на хромосомах жаб з різних ГПС, впливаючи на інтенсивність флуоресценції і ускладнюючи інтерпретацію даних (Dedukh et al., 2013). Іншим маркером, який широко використовується для ідентифікації батьківських хромосом, є теломерний повтор (TTAGGG)_n (Dedukh et al., 2013, 2015).

1.3.5. Молекулярні методи

Рестрикційний аналіз. Швидким, відносно дешевим і неінвазійним методом розрізнення батьківських видів та гібрида є рестрикційний аналіз, що базується на аналізі ПЛР фрагментів ITS2 (Internal transcribed spacer 2), отриманих після обробки рестриктазами. Рестриктаза *KpnI* розрізає *P. ridibundus*-специфічні ITS2 ПЛР продукти на два фрагменти розміром 47 та 224 пари нуклеотидів, в той час як рестриктази *HaeII* та *SmaI* розрізають *P. lessonae*-специфічні ITS2 ПЛР продукти на фрагменти розміром 48 і 223 та 62 і 209 пар нуклеотидів, відповідно. Однак, цей метод не є 100% надійним, оскільки в оригінальному дослідженні (Patrelle et al., 2011) тільки 83% з 93 проаналізованих особин були правильно визначені даним методом. Також рестрикційний аналіз не дозволяє відрізнити диплоїдів від триплоїдів.

ПЛР SAI-1. Даний метод базується на різниці в довжині ДНК фрагментів першого інтрону гену альбуміну (Serum albumin intron-1, SAI-1) *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Послідовність *P. lessonae* (~300-400 пар нуклеотидів) приблизно на 400-500 нуклеотидних пар коротша за послідовність *P. ridibundus* (~800 пар нуклеотидів) (Hauswaldt et al., 2012; Plötner et al., 2009). Таким чином, лише одна ПЛР і електрофорез в агарозному гелі дозволяють розрізнити батьківські види і гібридів між собою. За умови використання флуоресцентно-мічених праймерів можливо провести вимірювання інтенсивності флуоресценції, що дозволяє розрізнити три форми гібридів (LR, LLR та LRR) (Hauswaldt et al., 2012).

Мікросателітний аналіз. На сьогоднішній день одним з найбільш поширених методів вивчення зелених жаб з *Pelophylax esculentus* complex є використання мікросателітних маркерів. Мікросателіти являють собою тандемні повтори ДНК з довжиною однієї структурної одиниці не більше 6 нуклеотидів. Вони характеризуються високим рівнем мутацій через помилки при реплікації ДНК в лініях статевих клітин, що призводить до варіабельності в кількості тандемних повторів (Christiansen, 2005; Hotz et al., 2001).

Аналіз мікросателітних повторів є високо інформативним, швидким і надійним. Для кожної особини може бути проаналізована велика кількість індивідуальних локусів з використанням мінімальної кількості тканини (зазвичай для виділення ДНК використовується фаланга пальця, перетинка або кров). Існують мікросателітні локуси, що є специфічними виключно для *P. ridibundus* або *P. lessonae*. Також існують біспецифічні локуси, які однак мають різні алелі в *P. ridibundus* та *P. lessonae* (Arioli et al., 2010; Christiansen, 2005; Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009; Garner et al., 2000; Hotz et al., 2001; Zeisset et al., 2000).

Використання мікросателітного аналізу дозволяє визначити генотипи як батьківських видів, так і гібридів, а також відрізнити триплоїдів від диплоїдів, і різні форми триплоїдів між собою. Більш того, мікросателітний аналіз

дозволяє вивчати генетичне різноманіття і ідентифікувати клональні лінії геномів (Christiansen & Reyer, 2009; Doležalková-Kaštánková et al., 2018; Herczeg et al., 2017).

Проточна ДНК цитометрія. Найбільш точним методом визначення генотипів зелених жаб є використання проточної цитометрії для вимірювання кількості ДНК в клітині. Ядра клітин особин *P. ridibundus* містять на 16% більше ДНК ніж *P. lessonae* (відповідно, ~14 пг ДНК в диплоїдному наборі *P. lessonae* і ~16 пг ДНК в диплоїдному наборі *P. ridibundus*). Таким чином, диплоїдні гібриди містять близько 15 пг ДНК, а триплоїдні – 22 пг (LLR) та 23 (LRR), що дозволяє легко відрізнити різні форми між собою (Ogielska et al., 2004; Vinogradov et al., 1990, 1991).

Недоліками даного методу є висока вартість обладнання і можливі складності при інтерпретації даних. Також недоліком є те, що для вимірювання необхідне використання свіжих еритроцитів, які можуть лише недовгий час зберігатися у фізіологічному розчині (фіксовані у спирті чи інших фіксаторах клітини не підходять для даного методу).

Секвенування гену *uqcrfs1*. Одним з найновіших молекулярних методів визначення генотипів зелених жаб є аналіз однонуклеотидних поліморфізмів (SNP, single nucleotide polymorphisms) другого екзону ядерного гену убіквітінол цитохром С редуктази (*uqcrfs1*, Ubiquinol-Cytochrome C-Reductase) (Tecker et al., 2017). Даний метод заснований на ідентифікації видоспецифічних SNP з дозовим ефектом, що дозволяють ідентифікувати обидва батьківські геноми жаб *Pelophylax esculentus* complex, а також визначити геномну композицію триплоїдних гібридів.

1.3.6. Визначення геномів в гаметах

Хромосоми типу лампових щіток. Ідентифікація геномів, що передаються в ооцитах за допомогою каріоаналізу є складним завданням, оскільки ооцити є великими клітинами (до 4 мм в діаметрі) і містять дуже багато жовтку, що заважає отримати хромосомні препарати стандартними методами. Виділення та аналіз хромосом типу лампових щіток з ядер ооцитів, що знаходяться в процесі росту, дозволяє не тільки визначати кількість хромосом в ооцитах, але і визначати видоспецифічні характеристики хромосомної морфології (Bucci et al., 1990; Dedukh et al., 2013; Gall et al., 1991; Giorgi & Galleni, 1972). Хромосоми типу лампових щіток – це різновид мейотичних хромосом, що зустрічаються в ооцитах хребетних (за винятком сумчастих та плацентарних) на стадії диплотени мейозу I. Ці хромосоми містять велику кількість маркерних структур (латеральні петлі, аксіальні гранули тощо) та блоків конденсованого хроматину, що дозволяють надійну ідентифікацію кожної індивідуальної хромосоми (Dedukh et al., 2013; Macgregor, 1984; Morgan, 2002).

Pelophylax ridibundus та *P. lessonae* відрізняються за кількістю і розташуванням маркерних структур на хромосомах типу лампових щіток, що дозволяє ідентифікувати геноми, які передаються в ооцитах самиць *P. esculenus* (Bucci et al., 1990; Dedukh et al., 2013, 2015). Для жаб з *Pelophylax esculentus* complex зі Сходу України були створені хромосомні мапи (Dedukh et al., 2013).

Даний метод є точним і надійним, але одночасно складним і потребує багато кропіткої роботи. Більш того, зовсім невелика кількість ооцитів зі всього яєчника може бути проаналізована.

Аналіз білкових маркерів. Більш зручним методологічно (хоча іноді складнішим для інтерпретації) є метод аналізу білкових маркерів. Найбільш зручним є визначення алозимів лактатдегідрогенази-1 (ЛДГ-1), яка у великій

кількості знаходиться в ооцитах. Локус *ldh-b* є поліморфним у обох батьківських видів, *P. ridibundus* та *P. lessonae*. *Pelophylax ridibundus* мають два типи алелів: R^f та R^s , алелі що мігрують до катода швидко (f – fast) та повільно (s – slow), відповідно. Для *P. lessonae* було знайдено три алелі: L^f , L^s та L^i (з середньою швидкістю міграції; i – intermediate) (T. Uzzell & Berger, 1975). Для ооцитів *P. ridibundus* характерна наявність алелю R^f , а для *P. lessonae* – L^s . Таким чином, в ооцитах гібридів можуть знаходитись як один, так і два алелі (Mikulíček & Kotlík, 2001).

ДНК цитометрія сперматозоїдів. Для визначення геномів, що передаються самцями в сперматозоїдах використовується метод проточної ДНК цитометрії, що описаний в попередньому розділі.

1.3.7. Використання біоакустичних методів в таксономії безхвостих амфібій

Вокальна комунікація відіграє одну з найважливіших ролей в соціальній організації амфібій, в тому числі важлива для міжвидового та внутрішньовидового впізнавання. Найбільш вивченими і описаними для більшості видів безхвостих амфібій є шлюбні співи, які видають самці під час нересту для приваблення самиць. Шлюбні співи є видоспецифічними і можуть слугувати для розпізнавання видів в природі. Завдяки аналізу шлюбних співів вдається зафіксувати присутність інвазивних видів на нових територіях, де вони не були зафіксовані до цього (Bisconti, 2019).

Для зелених жаб з *Pelophylax esculentus* complex було показано, що шлюбні співи *P. ridibundus*, *P. lessonae* та *P. esculentus* відрізняються між собою. Більш того, різні типи триплоїдів мають відмінні шлюбні співи як від батьківських видів, так і від диплоїдних гібридів. Для усіх цих груп зелених жаб є характерним «ефект дозування геному»: виміряні параметри шлюбних

співів мали тенденцію до збільшення, чи зменшення в залежності від того, скільки геномів L чи R мали досліджувані особини (Hoffmann & Reyer, 2013). Шлюбні співи як гібридів, так і батьківських видів мають тенденцію відрізнятися в залежності від типу ГПС, географічної та генетичної відстані між популяціями (Hoffmann & Reyer, 2013).

Шлюбні співи є критично необхідними для репродуктивного успіху самців, що призводить до впливу на них статевого добору, а також викликає неабиякий інтерес у дослідників (Cocroft & Ryan, 1995; Gerhardt & Huber, 2002; Köhler et al., 2017; Marquez & Eekhout, 2006). Специфіка шлюбних співів полягає в тому, що вони є характерними виключно для однієї статі, що обмежує їх використання. З іншого боку, у більшості безхвостих амфібій (в тому числі і представників *Pelophylax esculentus* complex) крики вивільнення характерні як для самців, так і для самиць. Крик вивільнення видається «несприймаючими» амфібіями (самицями, що не готові до розмноження, самцями, або представниками інших видів у випадку гетероспецифічного амплексусу) під час спроби амплексусу.

Крики вивільнення, що на відміну від шлюбних співів спостерігаються у природі рідше, отримали відносно мало уваги з боку дослідників. Здебільшого дослідження були сфокусовані на порівнянні криків вивільнення зі шлюбними співами (Garda et al., 2010; Guerra et al., 2011; Köhler et al., 2017; Sullivan & Wagner, 1988).

Роль криків вивільнення є різною для різних статей. Самець видає крики вивільнення для того, щоб просигналізувати про свою стать іншому самцю, який взяв його в амплексус. Амплексус між двома самцями призводить до того, що вони обидва втрачають час і сили, що призводить до репродуктивного програшу. Самиці ж в свою чергу видають крики вивільнення, коли вони не готові до розмноження. Більш того, довгий помилковий амплексус є небезпечним для виживання обох статей, оскільки збільшує ризик втонути або бути впольованим хижаком, а також зменшує рухливість та можливість харчуватися (Bowcock et al., 2008, 2009; Szatecsny et al., 2006; Verrell &

McCabe, 1986). Іноді крики вивільнення самиць можуть бути направлені на самців інших видів, потенційно для уникнення гетероспецифічних схрещувань. В таких випадках тиск добору може призводити до стабілізації міжвидової різниці у вокалізації, підвищуючи її значення для таксономії (Köhler et al., 2017). Крики вивільнення можуть відрізнятися між близькоспорідненими видами (наприклад, Castellano et al., 2002), тому їх було запропоновано використовувати як одну з важливих таксономічних однак (Grenat & Martino, 2013).

В той час як шлюбні співи широко використовуються для визначення видового складу окремих популяційних систем, крики вивільнення можуть слугувати зручним інструментом для визначення таксономічної приналежності окремих особин, що належать до близьких морфологічно видів, як представники *Pelophylax esculentus* complex.

1.3.8. Аномалії розвитку зелених жаб

Аномалії амфібій широко зустрічаються в природних популяціях у Східній Європі і документувалися протягом багатьох років (наприклад, Dubois, 1979; Henle, Dubois, Rimpp, et al., 2017; Marushchak et al., 2021; Marushchak & Muravynets, 2018). Причини виникнення аномалій є різноманітними і можуть включати як генетичні фактори, так і зовнішні, пов'язані зі змінами в навколишньому середовищі. Серед останніх виділяють в першу чергу нестабільні та екстремальні умови, як то різкі зміни температури, рН води, висока щільність пуголовків, гормональний дисбаланс, забруднення води (в тому числі важкими металами), паразитичні трематоди, грибні або інші інфекції (Henle, Dubois, & Vershinin, 2017). Більшість амфібій є дуже сприйнятливими до змін в навколишньому середовищі, оскільки вони розвиваються поза організмом матері в яйцях, які не мають щільних оболонки (Henle, Dubois, & Vershinin, 2017).

Фіксування та моніторинг аномалій амфібій є важливим з двох причин: 1) висока кількість особин з аномаліями розвитку може слугувати індикатором екстремальних або нестійких умов навколишнього середовища (Henle, Dubois, Rimpp, et al., 2017; Katrushenko, 2020; Lunde & Johnson, 2012; Pinelli et al., 2019; Taylor et al., 2005); 2) важкі аномалії розвитку впливають на відтворення та життєздатність амфібій (наприклад, видозміни кінцівок можуть призводити до порушення амплексусу або ускладнення пересування).

На території України було задокументовано різноманітні аномалії амфібій за останні роки: аномалії кінцівок, хребта, голови, кісткових та шкірних виростів, відсутність або аномальна пігментація, деформація очей тощо (Marushchak & Muravynets, 2018; Nekrasova & Kuibida, 2018; Некрасова, 2008). В Харківській області Катрушенко С. (Катрушенко, 2020) вивчала зразки, що зберігаються в колекції Харківського національного природничого музею та порівнювала частоти аномалій з рівнем забруднення середовища.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Збір вибірок зелених жаб

Більшість вибірок зелених жаб збиралася протягом польових сезонів 2014-2023 рр. Жаб відловлювали здебільшого вручну вночі, осліплюючи ліхтарем, а також в денний час за допомогою сачка. Пуголовоків відловлювали сачком і тримали в контейнерах з водою об'ємом 5-6 л. Досліджувані локалітети на території України представлені на Рис. 2.1.

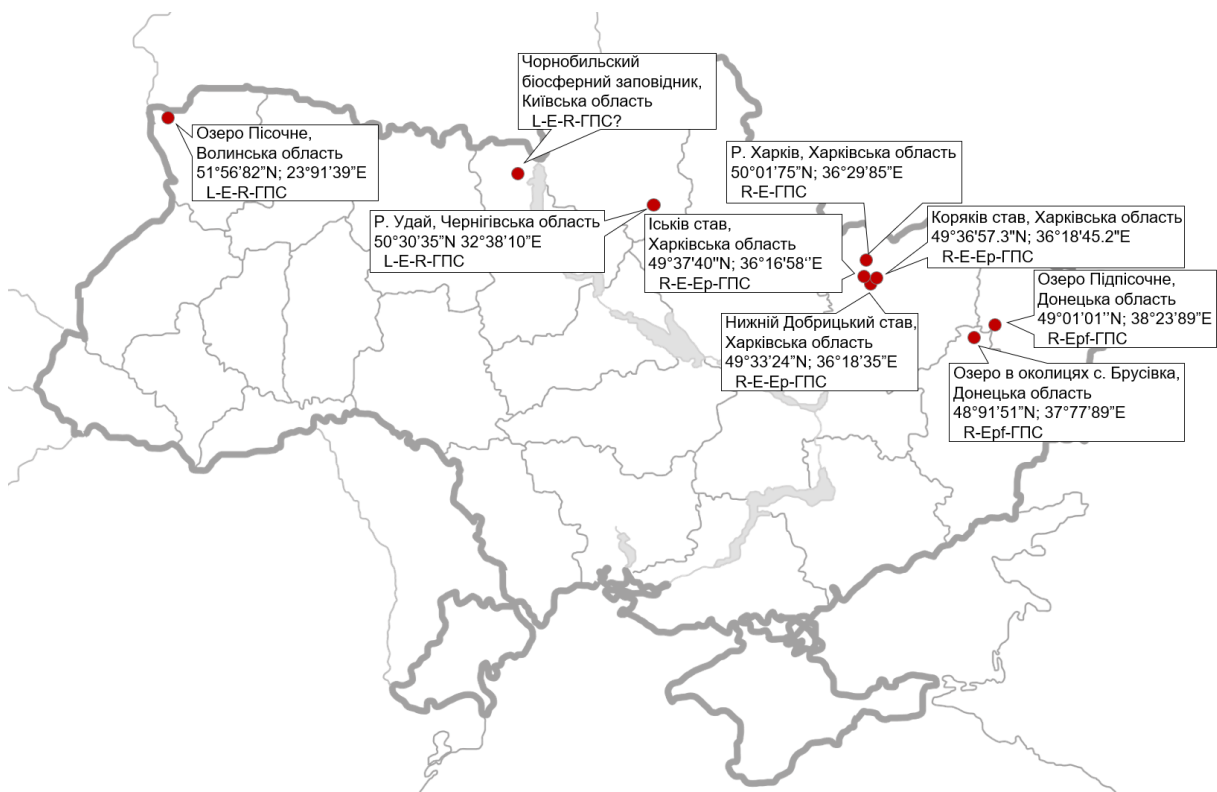


Рис. 2.1. Точки збору матеріалу в Харківській, Донецькій, Луганській, Київській, Чернігівській та Волинській областях України. Мапа – “Map of Ukraine political simple blank”, Sven Teschke, CC BY-SA 3.0.

Всього було проаналізовано більше 1200 представників *Pelophylax esculentus* complex. Кількість особин та методи, якими вони були проаналізовані представлені в таблиці 2.1.

Представники *Pelophylax esculentus* complex досліджені різними методами. Пуголки, дорослі і метаморфи пораховані разом. N/a – метаморфи або пуголки, для яких неможливо було визначити таксономічну приналежність

Метод	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. lessonae</i>	<i>Pelophylax</i> sp.
Морфологія / морфометрія	1114	95	1	-
Цитометрія еритроцитів	1064	90	1	-
Цитометрія сперматозоїдів	11	-	-	-
ДНК-цитометрія	22	15	-	-
Каріоаналіз	210	103	-	104
FISH	10	21	-	-
Електрофорез білкових маркерів	16	3	-	-
Мікросателітний аналіз	106	68	17	-
Секвенування гену <i>uqcrfs1</i>	53	2	-	-
Біоакустика	128	84	6	-
Аналіз аномалій розвитку	445	36	-	21

У всіх виловлених дорослих та ювенільних особин вимірювали довжину тіла (відстань від кінця морди до центру клоакального отвору) за допомогою штангенциркуля. У пуголок вимірювали довжину тіла з та без врахування довжини хвоста.

Окрім того, для біоакустичного аналізу також додатково використовувалися ще 53 особини жаб роду *Pelophylax* відловлених на території Італії, Чеської республіки та Албанії: п'ять видів (*P. ridibundus*,

P. lessonae, *P. kurtmuelleri*, *P. epeiroticus*, *P. bergeri*) та три міжвидових гібриди (*P. esculentus*, *P. hispanicus* та *P. grafi*). Цих жаб відловлювали, генотипували і надали для біоакустичного аналізу Холева Л., Долежалкова-Каштанкова М. та Лабаєва В. (Інститут фізіології та генетики тварин, Чеська Республіка).

Всі види роду *Pelophylax* використані в дисертаційному дослідженні не входять до переліку видів Червоної книги України та відносяться до категорії «найменший ризик» у червоному списку Міжнародного союзу охорони природи. Методи, використані для відлову, збору матеріалу та евтаназії деяких особин мали на меті мінімізувати страждання тварин відповідно до директиви 2010/63/EU Європейського союзу із захисту тварин, що використовуються для наукових досліджень (OJ L 276, 20.10.2010) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Робота виконана без порушення біоетичних норм проведення експериментальних робіт з тваринами відповідно до висновку біоетичної комісії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 1/23 від 15.03.23).

2.2. Визначення таксономічної приналежності за морфологічними ознаками

Первинне визначення таксономічної приналежності дорослих особин проводили за комплексом видоспецифічних морфологічних ознак (Kierzkowski et al., 2013; Шабанов, 2014), основними з яких були колір внутрішньої поверхні стегна, візерунок на спині, форма п'яткового бугора, характер стику задньомілкових зчленувань та у самців зелених жаб – колір резонаторів (Рис. 2.2).

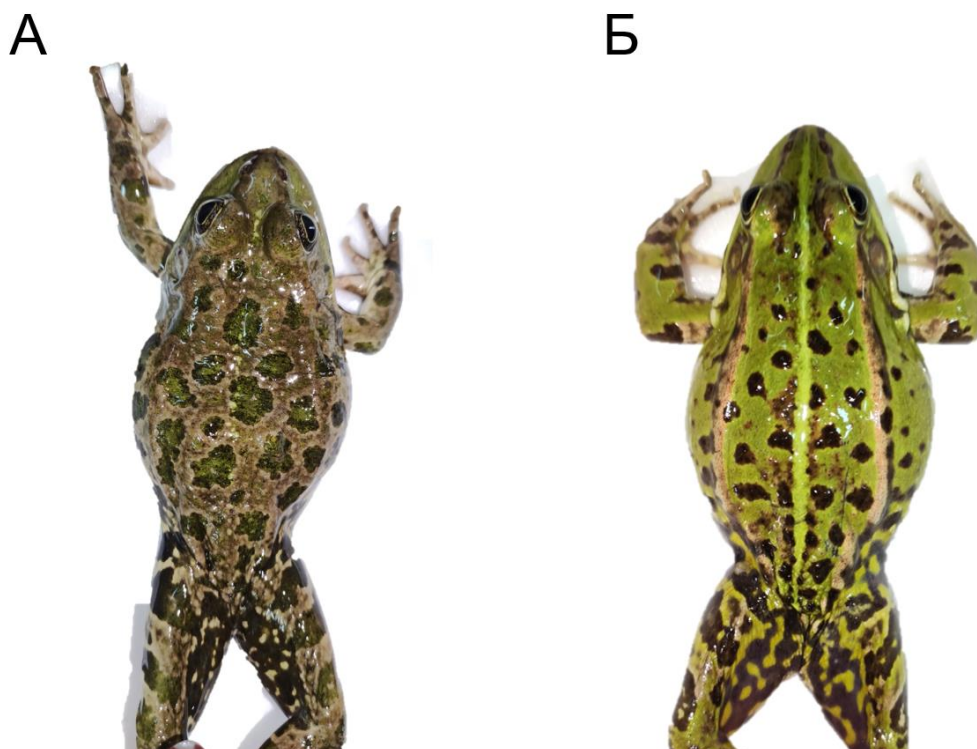


Рис. 2.2. Фото представників *P. ridibundus* (А) та *P. esculentus* (Б), на яких видно різницю в характері забарвлення та візерунку спини і стегон.

Для ювенільних особин та метаморфів морфологічні ознаки не завжди є достатньо надійним способом визначення таксономічної приналежності. Зазвичай такі особини потребують дорощування до стану, коли їх таксономічну приналежність можна надійно визначити за морфологією. Тому для частини ювенілів також використовувалися молекулярні або цитогенетичні методи (див. розділи «Цитометричні та цитогенетичні методи» та «Молекулярний аналіз»).

Оскільки для пуголовків не встановлено наявності видоспецифічних морфологічних ознак (Drohvalenko, 2021), їх таксономічну приналежність визначали за допомогою аналізу видоспецифічних мікросателітних маркерів, секвенування гену *uqcrfs1* та FISH (див. Розділ «Молекулярний аналіз»).

2.3. Визначення статі

Стать дорослих особин визначали за вторинними статевими ознаками. Для самців характерна наявність шлюбних мозолів на перших пальцях передніх кінцівок та резонаторів (Plötner, 2005).

Для самиць наявність вторинних статевих ознак не є характерною, тому іноді молодих самців, у яких ще не розвинулися резонатори та мозолі, було складно відрізнити від самиць. Таким особинам надавали статус «ювенілів» і не враховували в подальшому при аналізі співвідношення статей в популяціях, або визначали їх стать за морфологією гонад після розтину.

Стать пуголовків визначали за морфологією гонад (Рис. 2.3) (Christiansen, 2009; Naczkiwicz & Ogielska, 2013). Однак, оскільки статева диференціація гонад у пуголовків відбувається після 28 стадії розвитку, для більш молодих пуголовків визначити стать було неможливо (Chmielewska et al., 2018; Ogielska, 2009).

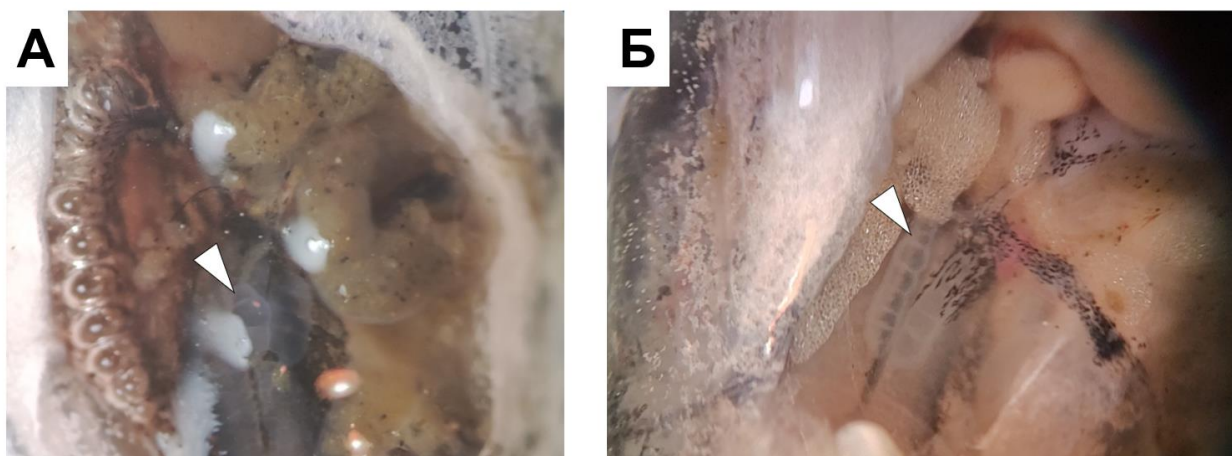


Рис. 2.3. Визначення статі пуголовків за морфологією гонад (Christiansen, 2009; Naczkiwicz & Ogielska, 2013). А – самець, Б – самиця. Стрілки вказують на гонади. Фото – Пустовалова Е.

2.4. Цитометричні та цитогенетичні методи

2.4.1. Цитометрія еритроцитів

Для первинного визначення плоїдності дорослих особин вимірювали довжину еритроцитів. Триплоїди містять в ядрі клітини приблизно в півтора рази більше ДНК, ніж диплоїди, що впливає на абсолютні розміри як ядра, так і клітин в цілому. Попередні дослідження зелених жаб з Сіверсько-Донецького центру різноманіття показали, що гранична довжина еритроцитів по великій осі, що створює межу між диплоїдами і триплоїдами, складає приблизно 26-28 мкм (Bondarieva et al., 2012). Однак, при аналізі цілої вибірки в першу чергу варто звертати увагу не на абсолютні розміри клітин, а на загальний патерн розподілу розмірів еритроцитів у всіх проаналізованих особин.

Для кожної дорослої особини виготовляли мазок крові: краплю крові наносили на предметне скло, розподіляли тонким шаром і висушували на повітрі. Кров брали з-за вушної вени (Forzán et al., 2012) або відрізаючи фалангу пальця. Препарати крові фотографували під $\times 40$ об'єктивом за допомогою мікроскопів Carl Zeiss Amplitval (камера TourCam AMA075, програмне забезпечення TourView) або Leica DM 2000 (камера Leica DFC3000 G, програмне забезпечення Leica LASX). На кожному препараті вимірювали довжину як мінімум 30 еритроцитів за допомогою програми TourView та вираховували середнє значення.

Для частини особин також вимірювали площину клітин та ядер еритроцитів. Препарати фарбували 2% розчином Гімзи протягом 4 хв при кімнатній температурі. Після висушування препарати фотографували під $\times 100$ об'єктивом за допомогою мікроскопу Provis BX53 Olympus. Міряли довжину великої і малої осі ядра та клітини у програмі TourView і розраховували площу ядра як площу еліпсу (Рис. 2.4).

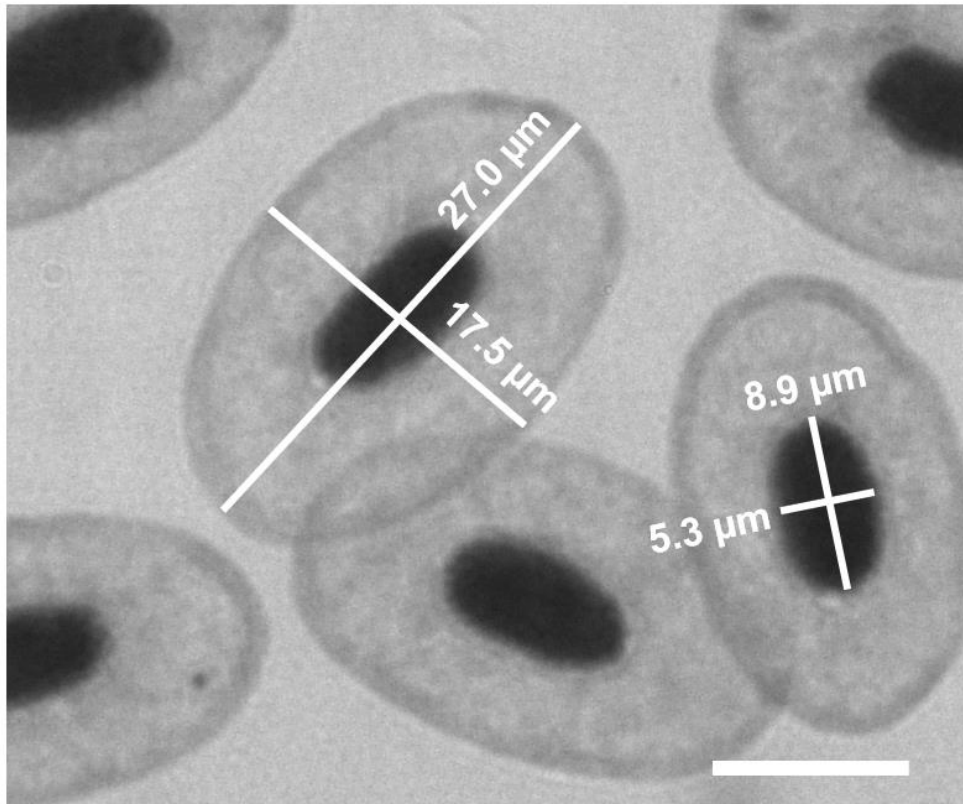


Рис. 2.4. Вимірювання довжин великої і малої осі ядра та клітини. Шкала – 10 мкм.

2.4.2. Каріоаналіз метафазних хромосом

Для частини дорослих особин, ювенілів, а також пуголовків визначення плоідності проводили за допомогою каріоаналізу. Дорослим та ювенільним жабам робили ін'єкцію 0,05% колхіцину на 12-18 годин, після чого присипляли парами етилацетату.

Пуголовків поміщали у 0,1% розчин колхіцину на 12-14 годин, після чого анестезували 2% розчином лідокаїну. Стадію розвитку пуголовків визначали за Госнером (Gosner, 1960).

Під час розтину у дорослих особин і ювенілів брали зразки кишківника та кісткового мозку, а у пуголовків кишківник і зябра. Тканини поміщали в гіпотонічний розчин 0,07М КСІ на 30 хвилин, далі центрифугували при 3000 об/хв та переносили у фіксатор Карнуа (3 частини етанолу або метанолу та 1

частина льодяної оцтової кислоти) на 30 хвилин. Фіксатор змінювали два рази, перед цим центрифугуючи зразки при 3000 об/хв. Для тканин пуголок фіксатор змінювали без центрифугування. Тканини зберігали у фіксаторі Карнуа в холодильнику при температурі +4°C.

Для приготування хромосомних препаратів маленькі шматки тканин (приблизно 5 мм²) гомогенізували в 100 мкл 70% розчину оцтової кислоти. Отриману суспензію клітин розкапували на предметне скло нагріте до +60°C і залишали на нагрівальному столику на 2 години.

2.4.3. Сріблення

Сріблення, або Ag-фарбування – метод диференційного забарвлення хромосом та інтерфазних ядер, який дозволяє виявити райони ядерцевих організаторів (ЯОР, сайти 18S + 28S рДНК). У більшості видів роду *Pelophylax* ЯОР знаходиться на довгих плечах однієї з малих хромосом, яку частіше за все поміщають під номером 9 (Heppich, 1978; Plötner & Klinkhardt, 1992; Манило et al., 2007). За кількістю ядерців в інтерфазних ядрах можна визначити плоідність особин у випадку, коли неможливо порахувати мітотичні хромосоми.

Ag-фарбування проводили за стандартною методикою (Macgregor & Varley, 1988) з додаванням желатину (Birstein, 1982). Свіжоприготований розчин AgNO₃ фільтрували через шприцевий фільтр Simplepure NY з порами 0,22 мкм, який мав зберігатися у непрозорому флаконі під час фарбування. До 10 мл 2% розчину желатину додавали 100 мкл мурашиної кислоти. На один препарат наносили 75 мкл желатину з мурашиною кислотою і 150 мкл нітрату срібла. Препарати накривали покривним склом і поміщали у вологу камеру без доступу світла. Камеру ставили у термостат розігрітий до +60°C на 4 хв. Після препарати промивали під проточною водою та дистиллятом, щоб змити залишки срібла, та висушували за кімнатної температури. Висушені препарати фарбували 2% розчином барвника Гімза протягом 4 хв.

Хромосомні препарати фотографували під $\times 100$ об'єктивом за допомогою мікроскопів Carl Zeiss Amplitival (камера TourCam AMA075, програмне забезпечення TourView) або Leica DM 2000 (камера Leica DFC3000 G, програмне забезпечення Leica LASX).

2.4.4. Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH)

Для проведення флуоресцентної гібридизації *in situ* з використанням перичентромерного повтору RrS1 (Ragghianti et al., 1995) хромосомні препарати первинно оброблялися 0,005% розчином пепсину в 1N HCl. Зонд специфічний до перичентромерних повторів *P. ridibundus* (праймери: 5'-AAGCCGATTTTAGACAAGATTGC- 3'; 5'-GGCSTTTGGTTACCAAATGC- 3' мітився біотином (Roche). Гібридизаційна суміш складалась з 50% розчину формаміду, 1мкл 20 \times буферу SSC, 10-50-кратного розчину ДНК сперми лосося, 20% розчину декстран сульфату та 2 мкм мічених зондів. Препарати денатурували в 75% розчині формаміду в 2 \times SSC на водяній бані протягом 3 хв. при температурі +73 $^{\circ}$ C. Гібридизаційну суміш денатурували в сухому термостаті при +86 $^{\circ}$ C протягом 6 хв. Далі суміш охолоджувалась протягом 10-15 хв. при температурі +4 $^{\circ}$ C. Після нанесення гібридизаційної суміші на препарат, їх накривали покривним склом та інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. Після відмивання препаратів в 0.2 \times SSC при +55 $^{\circ}$ C, біотин детектувався за допомогою стрептавідину кон'югованого з флуорохромом Alexa 488 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) протягом 2-3 годин при кімнатній температурі. Препарати відмивали в 4 \times SSC при +44 $^{\circ}$ C. Далі проводили дегідратацію в серії спиртів і покривали препарати розчином Vectashield antifade, що містив 1 мкг/мд DAPI (Vector, Burlingame, Calif., USA).

2.5. Визначення генотипів гамет самиць (аналіз алозимів LDH-1)

Для проведення білкового електрофорезу в ПААГ (Pagano, 2001) самиць зелених жаб присипляли за допомогою парів етилацетату та вилучали в них яєчники, що містять зрілі ооцити. Отримані тканини зберігали при температурі -20°C .

Наважку 100 мкг ооцитів гомогенізували в 400 мкл водного розчину гліцеролу (1 : 3), центрифугували протягом 5 хв при 13 000 об/хв при $+4^{\circ}\text{C}$. Загальну кількість білку вимірювали за допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 280 нм та 205 нм.

Електрофорез проводили в трис-гліцин поліакриамідному гелі (SDS ПААГ, 8%) з трис-борат електродним буфером (ТЕБ, рН 8,3). Специфічне забарвлення алозимів ЛДГ в гелі проводили за допомогою ензиматичної реакції з лактатом кальцію при 37°C протягом 1,5 годин. Реакційна суміш складалась з 80 мг лактату кальцію, 10 мг НАД, 5 мг нітрозин тетразолій хлориду і 5 мг феназин метосульфату розчинених у 50 мл ТЕБ.

Ідентифікацію алозимів проводили на основі їх міграційної рухливості до аноду (R алозими мігрують швидше за L) в програмі TotalLab 2.01. Для кожної плями розраховували значення Rf (відстань від старту до середини плями, поділену на загальну відстань, яку проходить фронт барвника), а також інтенсивність забарвлення плями.

Ензиматичну активність алозимів визначали за допомогою кінетичного УФ методу (Бондарєва та ін., 2013). Приблизно 100 мкг ооцитів гомогенізували у 2 мл фізіологічного розчину для холоднокровних (0,065% NaCl) і центрифугували при 13 000 об/хв при $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хвилин. Перед вимірюванням до 10 мкл надосадової рідини додавали реакційну суміш, яка складалась з 20 мкл пірувату (1 ммоль/л), 280 мкл фізіологічного розчину та 10 мкл NADH (0,009 г в 2 мл фізичного розчину). Вимірювали зменшення концентрації NADH + H⁺ на лінійній ділянці при 340 нм.

2.6. Молекулярний аналіз

2.6.1. Збір і зберігання зразків

У кожної з досліджуваних особин брали тканини для виділення ДНК, які зберігали у 1,5 або 2 мл пробірках в 70% або 96% розчині етилового спирту. У дорослих особин брали кров з завушної вени (Forzán et al., 2012) або відрізали фалангу пальця на передній лапі. У пуголоків відрізали частину хвостового плавця або (у випадку якщо пуголок присипляли для подальшого каріоаналізу) все тіло пуголок поміщали в етиловий спирт. Пробірки з матеріалом зберігалися з холодильнику при температурі +4°C.

2.6.2. Виділення ДНК

ДНК виділяли з зафіксованої у 70% або 96% етиловому спирті крові, фаланги пальця (для дорослих жаб) або хвостового плавця (для пуголоків) за допомогою універсального набору E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek, USA) та Geneaid™ DNA Isolation Kit (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan) відповідно до протоколів виробників.

Виділення ДНК, подальша ПЛР ампліфікація мікросателітних послідовностей, а також ПЛР-ампліфікація та секвенування гену *uqcrfs1* проводились на базі кафедри зоології університету Коменського (Братислава, Словаччина).

2.6.3. ПЛР-ампліфікація мікросателітних послідовностей

Було відібрано 17 мікросателітних локусів, які є видоспецифічними для *Pelophylax esculentus* complex та допомагають відрізнити L та R геноми між собою. Локуси було розподілено на чотири мультиплекси:

Мультиплекс 1: GA1A19 (Arioli et al., 2010; Pruvost et al., 2013), R1CA18, R1CA1b5 (Garner et al., 2000), R1CA2a34 (Christiansen & Reyer, 2009).

Мультиплекс 2: Re1Caga10, Re2Caga3 (Arioli et al., 2010), R1CA1b20 (Garner et al., 2000), Rrid059A (Christiansen & Reyer, 2009; Hotz et al., 2001).

Мультиплекс 3: RICA5 (Garner et al., 2000), Rrid082A (Hotz et al., 2001), Res17, Res22 (Zeisset et al., 2000).

Мультиплекс 4: Rrid171A (Hotz et al., 2001), CA1a27, Ga1a23, Rrid064A, Rrid135A (Christiansen & Reyer, 2009).

В додатку 5 наведено назви локусів, розмір і кількість алелів відповідно до отриманих нами результатів.

Ампліфікацію мікросателітних маркерів проводили в реакційному об'ємі 10 мкл, що містив 5 мкл 2x Qiagen multiplex PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), 1 мкл Q solution, 0,2 мкл праймеру до кожного мікросателітного локусу (прямий і зворотній), 1 мкл ДНК і відповідну кількість води, що залежала від кількості праймерів в кожному мультиплексі. ПЛР проходила в такому порядку: 5 хвилин первинної денатурації при 95°C, 30 циклів по 30 секунд при 95°C, 90 секунд при 60°C, 30 секунд при 72°C, та фінальні 30 хвилин при 60°C.

Аналіз алелів проводили за допомогою програми GeneMarker® (SoftGenetics, USA). Клональні геноми ідентифікували шляхом конструювання мультилокусних генотипів за допомогою пакету GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012). Алельне різноманіття рахували як «середню кількість алелів на локус» (Hughes et al., 2008).

В якості контролю, для диференціації L геномів, до аналізу було додано одну особину *P. lessonae* з басейну річки Псел та 16 особин *P. lessonae* із західної Словаччини (Čičov, 47.778 N, 17.749 E; Sap, 47.821 N, 17.617 E; Veľký lél, 47.755 N, 17.947 E; Rusovce, 48.057 N, 17.154 E; Závod, 48.541 N, 16.988 E). Останні були надані Мікулічком П. (Університет Коменського, Братислава, Словаччина).

2.6.4. ПЛР-ампліфікація та секвенування гену *uqcrfs1*

Ампліфікацію другого екзону гену *uqcrfs1* проводили в реакційному об'ємі 25 мкл відповідно до опублікованої раніше методики (Tecker et al., 2017).

ПЛР проводили в наступному порядку: 3 хвилини первинної денатурації при 96°C, 30 циклів по 30 секунд при 94°C, 40 секунд при 60°C, 60 секунд при 72°C, та фінальні 5 хвилин при 72°C.

Аналіз послідовностей гену *uqcrfs1* проводили за допомогою програми BioEdit v7.1.7 (Hall, 1999).

2.6.5. Проточна ДНК-цитометрія

Зразки крові зберігали в розчині Версена терміном не більше 2 тижнів. Для аналізу еритроцити переміщали в розчин Версена, в який також входили 0,1% Тритон та 0,02% DAPI. Визначення плоідності клітин проводили за допомогою Aria flow sorter and flow cytometer на базі Інституту фізіології та генетики тварин (Чеська республіка).

2.7. Гормональна стимуляція самців і взяття зразків сперми

Для отримання уринальної сперми самцям проводили гормональну стимуляцію сперматогенезу. Статевозрілим самцям зелених жаб робили ін'єкцію Сурфагону (концентрація 5 мг/мл, ТОВ "Ланс-Хім", Україна), синтетичного аналогу люліберину, гонадотропного релізінг-гормону, в підшкірний лімфатичний мішок (Боброва та ін., 2014). Кожна особина отримувала 2-2,5 мкл сурфагону в залежності від свого розміру. Через 2 години після ін'єкції за допомогою піпетки Пастера з клоаки брали зразок уринальної сперми. Отриману суспензію фіксували в розчині Карнуа (3 частини метанолу чи етанолу і 1 частина льодяної оцтової кислоти) та центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв. Преципітат переносили до 100 мкл 70% оцтової кислоти. Отриману суспензію розкапували на предметне скло нагріте до +60°C. Протягом такої фіксації у розчині Карнуа та оцтовій кислоті

сперматозоїди зазвичай втрачають хвости, тому тільки головки сперматозоїдів доступні для подальшого аналізу.

Препарати сперми фотографували під $\times 40$ об'єктивом за допомогою мікроскопу Leica DM 2000 (камера Leica DFC3000 G, програмне забезпечення Leica LASX). Довжини головок сперматозоїдів вимірювали в програмі TourView за допомогою інструментів "Line" та "Ark" для прямих і викривлених клітин, відповідно (Рис. 2.5).

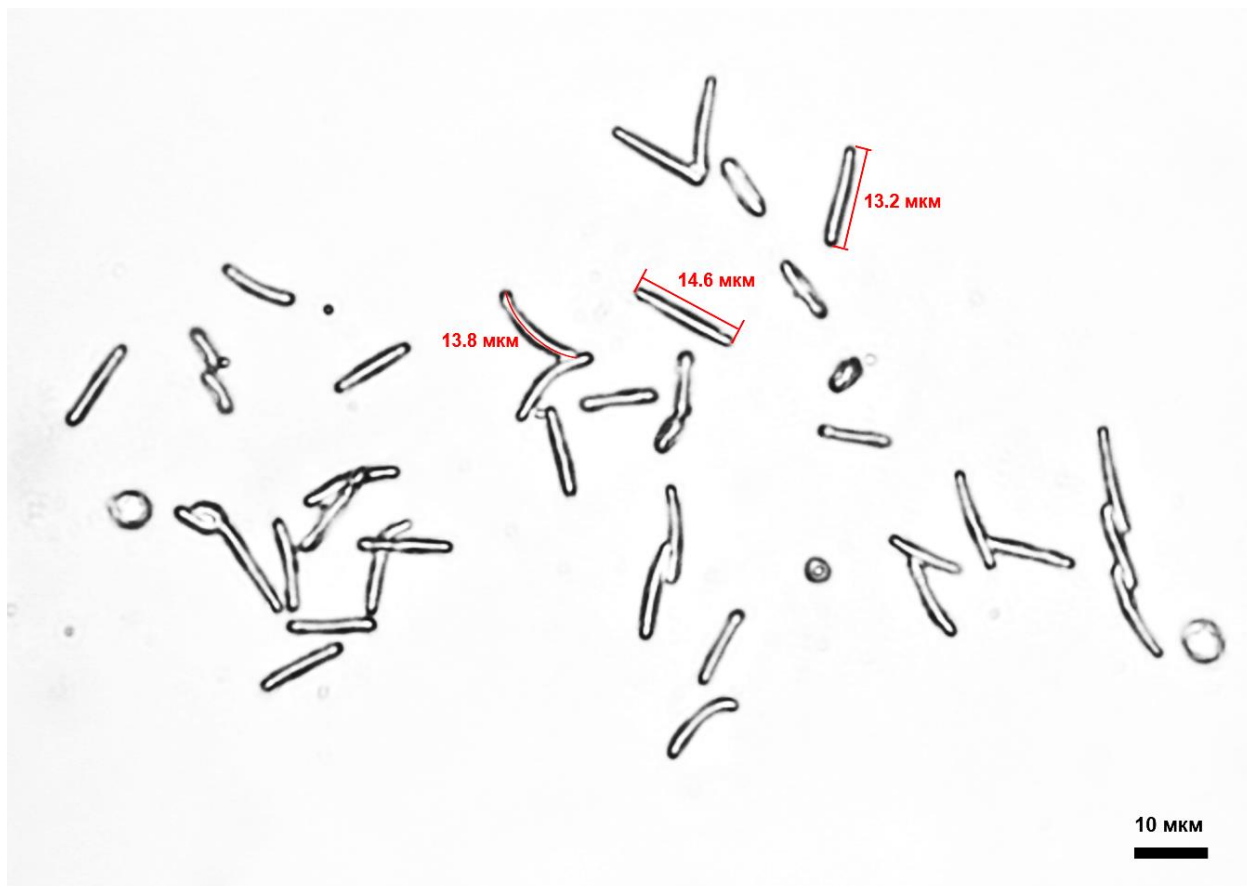


Рис. 2.5. Приклад фото для вимірювання довжини головок сперматозоїдів зі зразків уринальної сперми самців *P. esculentus*. Хвости сперматозоїдів втрачено в процесі фіксації клітин під дією фіксатора Карнуа.

Для оцінки продуктивності сперматогенезу кожного самця ми підраховували приблизну кількість сперматозоїдів в кожній краплі суспензії сперми (~50 мкл) на слайді. У випадку, якщо кількість сперматозоїдів на препараті перевищувала 1000, ми вважали, що такі самці мали високу

продуктивність сперми, у тих, хто мав 100-1000, продуктивність оцінювалась як середня, і <100 як низька. Для самців з високою та середньою продуктивністю ми вимірювали довжини 100-150 сперматозоїдів. Для самців з низькою продуктивністю – всі клітини, які можливо було знайти на препараті.

2.8. Методика штучних схрещувань

Штучні схрещування проводили за методикою запропонованою Л. Бергером (Berger et al., 1994) з рядом модифікацій (Drohvalenko, 2021). Стимуляцію продукції гамет проводили за допомогою ін'єкції Сурфагону. Самиці отримували ін'єкцію 2,5-3,5 мкл гормону в залежності від розмірів тіла за 24 години до схрещувань. Для самців методика описана у розділі «Гормональна стимуляція самців і взяття зразків сперми». Перед схрещуваннями перевіряли активність сперми самців: краплю отриманої суспензії сперми аналізували під світловим мікроскопом на наявність клітин, що активно рухаються.

Для отримання ікри самиць обережно стискали з боків і вичавлювали ікру в чашки Петрі. Далі на отриману ікру виливали суспензію сперми, додавали невелику кількість чистої відстояної води і залишали в чашці Петрі на добу для проходження запліднення. З чашок Петрі кладки переносили до ємностей об'ємом 3-4 л з відстояною водою через добу після схрещувань. Воду у кожній ємності насичували киснем за допомогою аератора, а нижній температурний ліміт в +22-23°C контролювали за допомогою термоконтролера. Всі ємності мали рівномірний доступ до сонячного світла. Через декілька днів всі кладки перевіряли на наявність нерозвинених яєць, які прибирали з ємності, щоб запобігти отруєнню живих ембріонів, яких далі розподіляли по додаткових ємностях таким чином, щоб в кожній була приблизно однакова щільність особин. Годування сухим кормом «TetraMin» починали після того, як більшість пуголовків з кладки починали активно

рухатись. Раз на день ємності чистили від продуктів життєдіяльності пуголовків, прибирали померлих особин та замінювали воду.

2.9. Біоакустичні методи

Запис криків вивільнення зелених жаб проводили в лабораторних умовах при температурі ~ 25 °C за допомогою фотоапаратів Nikon Coolpix P500 та Nikon D3100, або аудіорекордери Tascam DR-05X які поміщали на відстані 20-30 см від особин. Стимуляцію вокалізації проводили стискаючи особин з боків вказівним та великим пальцем для симулювання амплексусу (Leary, 1999; Tada et al., 2001).

Запис криків вивільнення зелених жаб роду *Pelophylax* (окрім вибірки *P. ridibundus* та *P. esculentus* з локалітетів басейну Сіверського Дінця) проводили на базі Інституту фізіології та генетики тварин (Лібехов, Чеська республіка).

При аналізі криків вивільнення використовували «call-centered» підхід, який описує крик як «main coherent sound unit (longer than a typical pulse), separated from other such units by a distinct period of silence» (Köhler et al., 2017). Аудіо файли нормалізували за амплітудою та очищали від фонового шуму за допомогою програми Audacity® v. 2.1.2 (Audacity Team 2015). Акустичний аналіз проводили у програмі Raven Pro 1.6.1 (Bioacoustics Research Program 2019; Cornell Lab of Ornithology). На осцилограмах вимірювали тривалість крику у секундах та кількість піків в кожному крику. Для вимірювання спектральних параметрів проводили швидке перетворення Фур'є (Fast Fourier Transform, FFT) з перекриттям 50% та вимірювали наступні параметри: пікова (домінантна) частота, мінімальна частота, максимальна частота та діапазон частот. Для кожної особини аналізували чотири послідовних крики вивільнення та вираховували середнє значення кожного з вимірних параметрів для подальшого статистичного аналізу.

Коефіцієнти варіації (Coefficient of Variation, CV) розраховували відповідно Gerhardt (1991). Параметри з CV менше 5% визначалися як статичні, а з CV більше 10% як динамічні.

2.10. Визначення зовнішніх морфологічних аномалій

Аномалії розвитку зелених жаб визначали при візуальному огляді особин за класифікаціями запропонованими Некрасовою О. Д. (Некрасова, 2008), Meteyer С. (Meteyer, 2000) та Катрушенко С. (Катрушенко, 2020). Для кожної особини звертали увагу на структуру, на кількість кінцівок і пальців, особливості забарвлення черева та спини, наявність, форму і забарвлення очей, а також загальну морфологію тіла. Всі виявлені аномалії фіксувалися та фотографувалися. Розраховували частоту трапляння особин з аномаліями за формулою: $N_a/N*100\%$, де N_a – кількість особин з аномаліями у вибірці, N – загальна кількість особин у вибірці.

2.11. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили за допомогою програм Microsoft Excel (в тому числі розширення GeneAlex), Statistica 10 (StatSoft) та програмного середовища R. Для встановлення відповідності розподілу нормальному використовували тест Шапіро-Вілка. Для порівняння груп використовували тест ANOVA (у випадку нормального розподілу) або Краскела-Воліса (у випадку розподілу відмінного від нормального). У випадках порівняння декількох груп використовувалась поправка Холма-Бонфероні. Кореляцію визначали за допомогою критерію Пірсона. Також проводили дискримінантний аналіз та аналіз головних компонент.

РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТАКСОНОМІЧНОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ, ПЛОЇДНОСТІ ТА ГЕНОМНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ

3.1. Нові підходи до визначення зелених жаб за біоакустичним аналізом

3.1.1. Крики вивільнення зелених жаб роду *Pelophylax*

Шлюбні співи є видоспецифічними для представників роду *Pelophylax* (Hoffmann & Reyer, 2013). Однак, їх використання обмежене тільки самцями і підходить лише для загальної оцінки наявності того, чи іншого виду в популяції. З іншого боку, крики вивільнення характерні для обох статей. На прикладі досліджень шпоркових жаб *Xenopus* було показано, що крики вивільнення відрізняються між багатьма близькими видами і надають важливу філогенетичну інформацію (Tobias et al., 2014). Саме тому ми дослідили можливість використання криків вивільнення для визначення видової приналежності окремих особин роду *Pelophylax* (Fedorova, 2023).

Філогенетичний аналіз мітохондріального геному зелених жаб роду *Pelophylax* показав, що вони поділяються на три основні групи: *lessonae*, *ridibundus* та *perezi* (Lymberakis et al., 2007). Ми вперше провели якісний та кількісний аналіз криків вивільнення трьох видів, що відносяться до груп *lessonae* та *ridibundus* (*P. kurtmuelleri*, *P. epeiroticus*, *P. bergeri*) і одного міжвидового гібрида (*P. hispanicus*), а також додали до порівняння *P. ridibundus*, *P. esculentus* та *P. lessonae* (особини з декількох ГПС Центральної Європи), чії крики вивільнення вже були описані раніше (Fedorova & Shabanov, 2022; Wahl, 1969; Weber, 1976; Zamfirescu, 2000, 2001, 2002a).

Загалом, в червні 2022 було записано крики вивільнення 54 зелених жаб п'яти видів і двох міжвидових гібридів (Таблиця 3.1, Додаток 2).

Таблиця 3.1

Загальна характеристика зелених жаб використаних для біоакустичного аналізу криків вивільнення. Жирним виділені види та гібриди, для яких крики вивільнення описано вперше.

Таксономічна приналежність	№ особин		Лінія
	Самці	Самиці	
<i>P. kurtmuelleri</i> (Gayda, 1940)	5	3	<i>ridibundus</i>
<i>P. epeiroticus</i> (Schneider, Sofianidou & Kyriakopoulou-Sklavounou, 1984)	1	2	<i>ridibundus</i>
<i>P. ridibundus</i> (Pallas, 1771)	8	3	<i>ridibundus</i>
<i>P. esculentus</i> (Linnaeus, 1758)	5	8	Гібрид <i>P. ridibundus</i> та <i>P. lessonae</i>
<i>P. lessonae</i> (Camerano, 1882)	5	1	<i>lessonae</i>
<i>P. bergeri</i> (Günther, 1985)	5	6	<i>lessonae</i>
<i>P. hispanicus</i> (Bonaparte, 1839)	-	3	Гібрид <i>P. ridibundus</i> та <i>P. bergeri</i>

Загалом було проаналізовано 224 крики вивільнення (для тих виду чи статі, що були представлені лише однією особою аналізувалися вісім криків, для інших – по чотири).

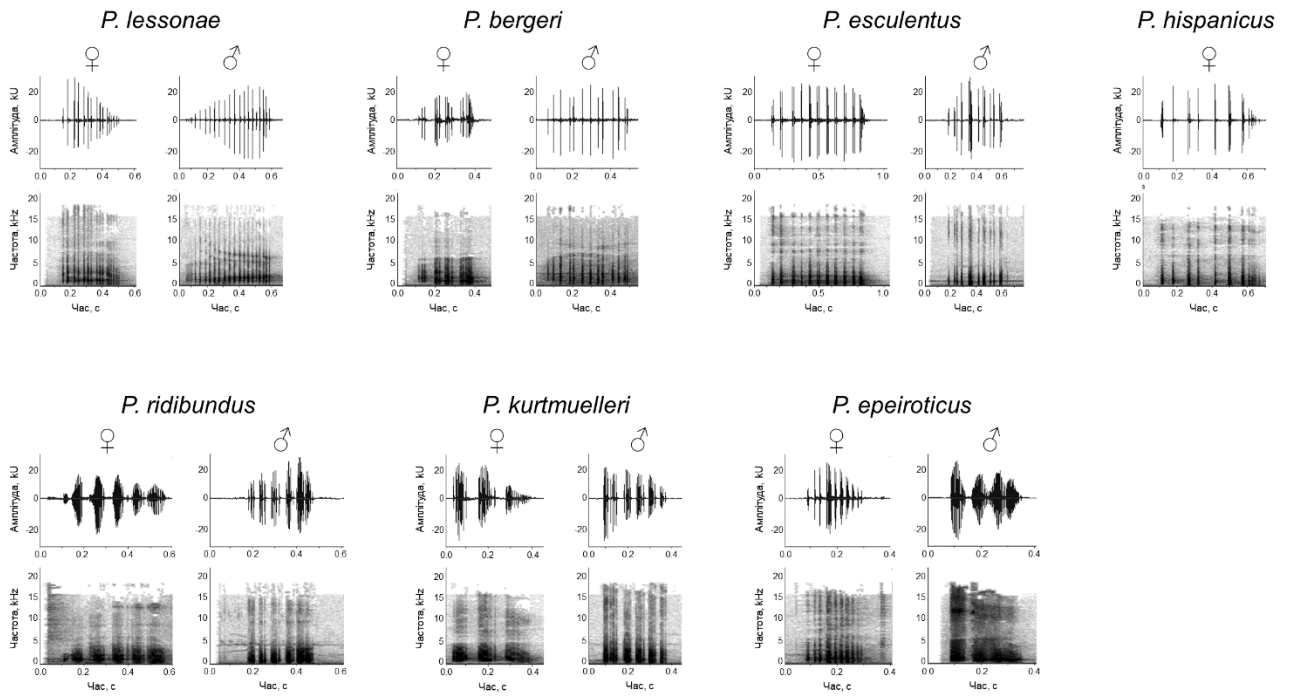


Рис. 3.1. Осцилограми (вгорі) та спектрограми (внизу) зелених жаб п'яти видів і трьох міжвидових гібридів

Крики вивільнення жаб з групи *lessonae* (*P. bergeri*, *P. lessonae*) характеризуються окремими піками з короткими інтервалами тиші між ними (Рис. 3.1). Тоді як в криках вивільнення жаб з групи *ridibundus* (*P. ridibundus*, *P. kurtmuelleri*, *P. epeiroticus*) піки здебільшого зібрані в групи. *Pelophylax esculentus* та *P. hispanicus*, які є гібридами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, та *P. ridibundus* і *P. bergeri*, відповідно, мають осцилографічні патерни ближчі до батьківського виду з групи *lessonae*, ніж з групи *ridibundus*.

Для кожного крику вивільнення вимірювали наступні параметри: тривалість крику у секундах, кількість піків в кожному крику, частота піків на один крик, пікова (домінантна) частота, мінімальна частота, максимальна частота та діапазон частот.

Майже всі виміряні параметри виявилися динамічними зі значеннями $CV > 10\%$. Параметри зі значеннями CV менше 10% були характерні тільки для тих груп жаб, що були представлених лише однією особою. Таким

чином, жоден з проаналізованих параметрів не може вважатися видоспецифічним.

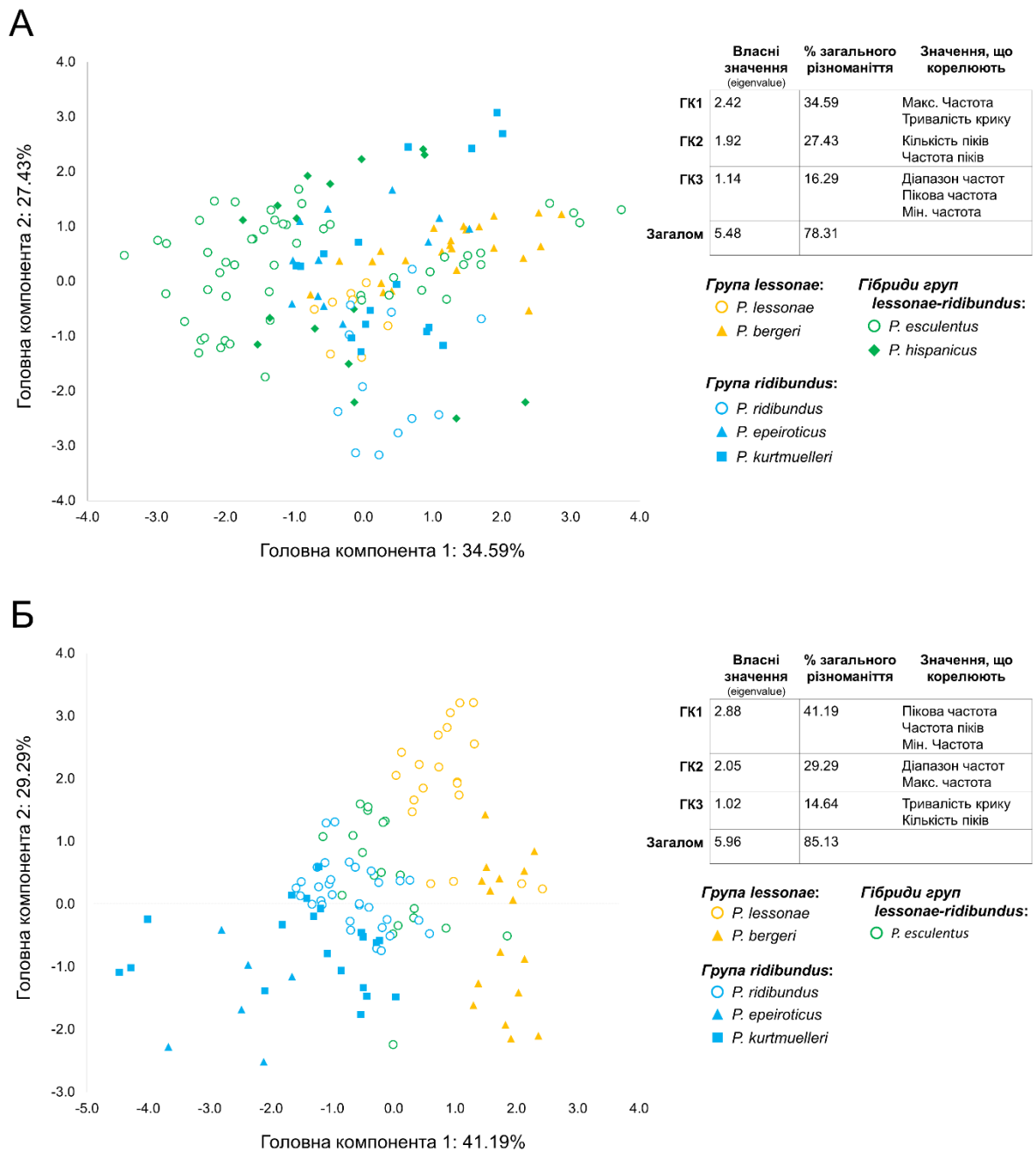


Рис. 3.2. Результати аналізу головних компонент для самиць (А) та самців (Б). Кожна точка на графіку відображає один проаналізований крик вивільнення. Для кожної особини проаналізовано від чотирьох до восьми криків вивільнення.

Результати аналізу головних компонент показали, що крики вивільнення проаналізованих самців чітко розділяються на групи *ridibundus* та *lessonae*, тоді як крики вивільнення гібридів носять проміжний характер. Всередині ліній також спостерігається відмінність між криками вивільнення представників різних видів (Рис. 3.2 Б). Однак, для самиць подібна картина не була характерна: крики вивільнення більшості проаналізованих самиць змішувалися в одну групу (Рис. 3.2 А).

3.1.2. Крики вивільнення *P. esculentus* і *P. ridibundus* Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Ми більш детально проаналізували крики вивільнення *P. esculentus* та *P. ridibundus* басейну Сіверського Дінця (Fedorova & Shabanov, 2022). Потягом 2014-2021 рр. було проаналізовано 732 крики вивільнення 191 особини зелених жаб, серед яких 118 *P. esculentus* (84 самців і 34 самиці) та 73 *P. ridibundus* (44 самця і 29 самиць) (Таблиця 3.2, Додаток 3). Серед гібридів вісім особин виявилися триплоїдами (п'ять самців і три самиці), які в подальшому аналізувалися окремо від диплоїдних гібридів.

Таблиця 3.2

Вибірки зелених жаб, використаних для біоакустичного аналізу

Локалітети	Географічні координати	<i>P. esculentus</i>				<i>P. ridibundus</i>		Всього
		♂, 2n	♀, 2n	♂, 3n	♀, 3n	♂	♀	
Р. Сіверський Донець	49°37'23"N; 36°19'53"E	26	5	-	-	44	16	91
Іськів став	49°37'40"N; 36°16'58"E	2	3	-	-	-	-	5
Нижній Добрицький став	49°33'24"N; 36°18'35"E	28	15	2	1	-	14	60
Коряків став	49°36'57"N; 36°18'45"E	17	5	3	2	-	-	27
Всього		79	31	5	3	44	29	183

Загальна структура криків вивільнення відрізнялася між таксономічними групами. Крики *P. esculentus* обох статей склалися з одинарних або подвійних піків з приблизно однаковим періодом тиші між ними (Рис. 3.1.2.1 А, Б). Подібні окремі піки не спостерігалися у *P. ridibundus*. В більшості криків вивільнення *P. ridibundus* як самців, так і самиць, можна виділити групи піків. Загальна кількість піків була вищою у самиць *P. esculentus*, і нижчою у самців. Схожа картина спостерігалась і у *P. ridibundus*: кількість піків була вищою у самиць в порівнянні з самцями.

Осцилограми та спектрограми представників *P. esculentus* та *P. ridibundus* з Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб (Рис. 3.3) відповідають осцилограмам та спектрограмам *P. esculentus* та *P. ridibundus* із Центральної Європи (див. розділ 3.1.1. «Крики вивільнення зелених жаб роду *Pelophylax*», Рис. 3.1).

Більшість криків самців *P. esculentus* (71%) починаються з декількох піків низької амплітуди, відділених від основного крику паузою. Подібні низькоамплітудні піки не спостерігалися у самиць *P. esculentus*.

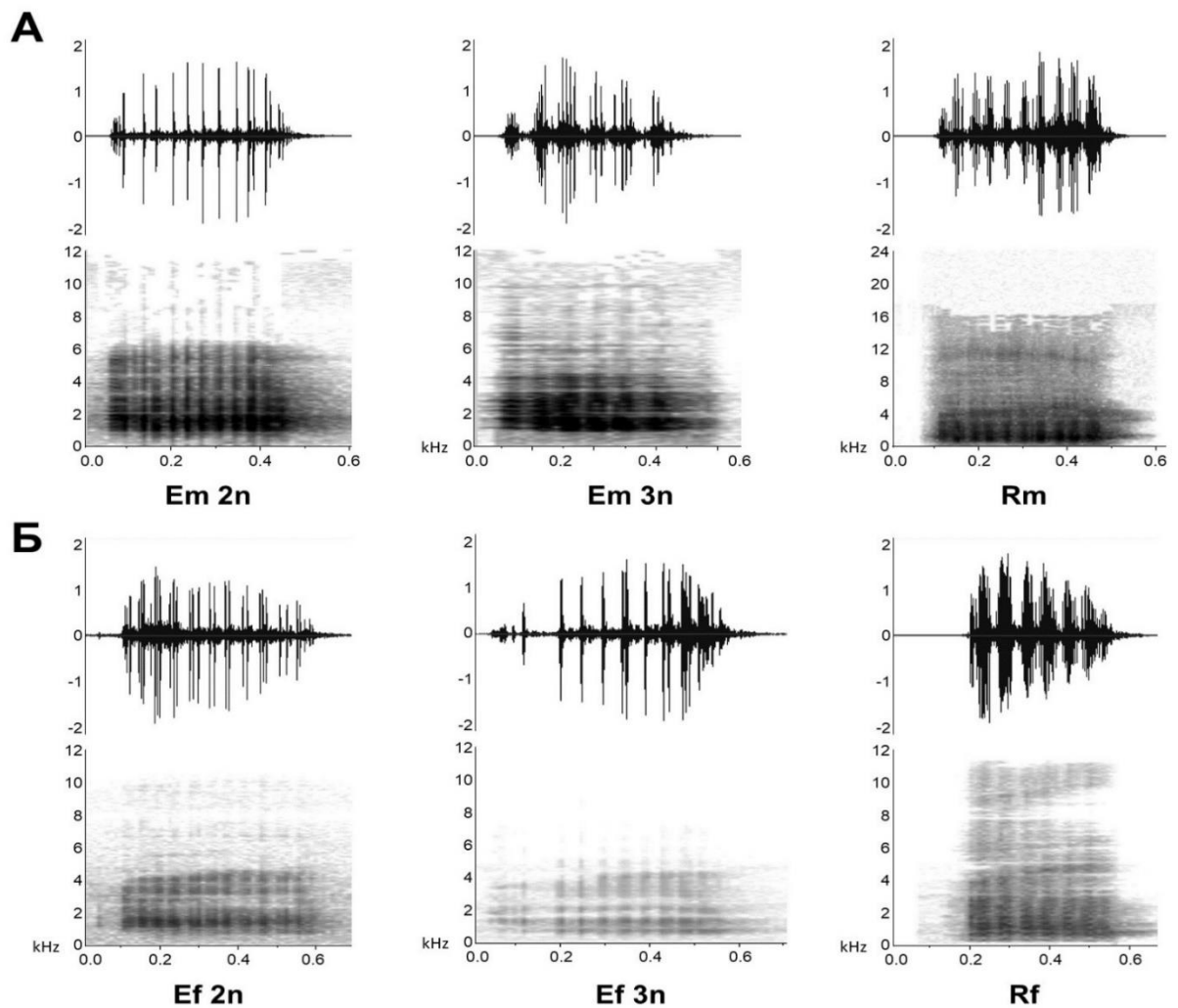


Рис. 3.3. Осцилограми та спектрограми криків вивільнення самців (А) та самиць (Б) *P. esculentus*: Ef 2n – *P. esculentus* диплоїдні самиці, Em 2n – *P. esculentus* диплоїдні самці, Ef 3n – *P. esculentus* триплоїдні самиці, Em 3n – *P. esculentus* триплоїдні самці, Rf – *P. ridibundus* самиці, Rm – *P. ridibundus* самці.

За результатом аналізу головних компонент було виділено 3 компоненти з власними значеннями (eigenvalues) > 1.0, які пояснювали 83.3% загального різноманіття (Таблиця 3.3, Рис. 3.4).

Результати аналізу головних компонент. ГК – головна компонента.

	ГК 1	ГК 2	ГК 3	Загалом
Власні значення (eigenvalues)	2.9	1.8	1.05	5.8
% загального різноманіття	41.8	26.4	15.1	83.3
Значення, що корелюють	Мінімальна частота Максимальна частота Діапазон частот Пікова частота	Кількість піків Частота піків	Тривалість крику	

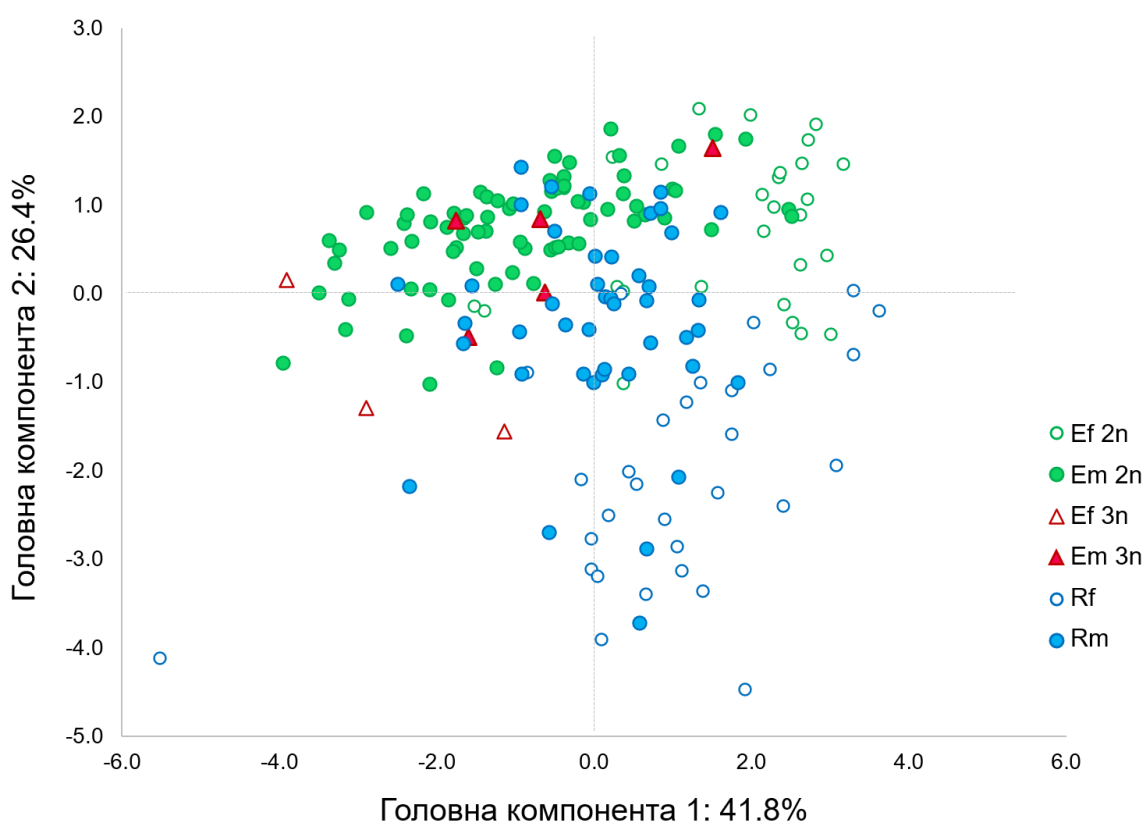


Рис. 3.4. Результати аналізу головних компонент: Ef 2n – *P. esculentus* диплоїдні самиці, Em 2n – *P. esculentus* диплоїдні самці, Ef 3n – *P. esculentus* триплоїдні самиці, Em 3n – *P. esculentus* триплоїдні самці, Rf – *P. ridibundus* самиці, Rm – *P. ridibundus* самці.

В результаті дискримінантного аналізу з використанням семи вимірних параметрів криків вивільнення було отримано дві дискримінантні функції, що

були значущими. Лише 69,6% особин було правильно прокласифіковано, тоді як всі триплоїди були прокласифіковані неправильно (Таблиця 3.4), що відповідає результатам аналізу головних компонент (Рис. 3.4). Найкраще класифікація спрацювала для самців *P. esculents* (90,5% правильно прокласифікованих особин) та самиць *P. ridibundus* (75,9% правильно прокласифікованих особин).

Таблиця 3.4

Результати дискримінантного аналізу на основі трьох часових і чотирьох частотних характеристик.

Сіра заливка – правильно прокласифіковані особини.

Реальні	Передбачені						% правильно передбачених
	Ef 2n	Ef 3n	Rf	Em 2n	Em 3n	Rm	
Ef 2n	15	0	2	6	0	5	53,57
Ef 3n	1	0	0	0	0	2	0,00
Rf	2	0	23	0	0	5	76,66
Em 2n	7	0	0	67	0	0	91,89
Em 3n	0	0	0	4	0	1	0,00
Rm	2	0	7	13	0	22	50,00

Вищі значення кількості піків та частоти піків були характерні для *P. ridibundus* обох статей, тоді як триплоїдні гібриди мали середню позицію між диплоїдними *P. esculentus* та *P. ridibundus* (Рис. 3.5). Частотні параметри відрізнялися лише між самицями: *P. ridibundus* мали вищі значення за *P. esculentus* (Рис. 3.5). *Post hoc* аналіз з використанням критерія Крускала-Волліса показав, що найменш варіабельним між досліджуваними групами жаб була тривалість крику вивільнення. Найбільш варіабельними виявилися кількість та частота піків (Рис. 3.5).

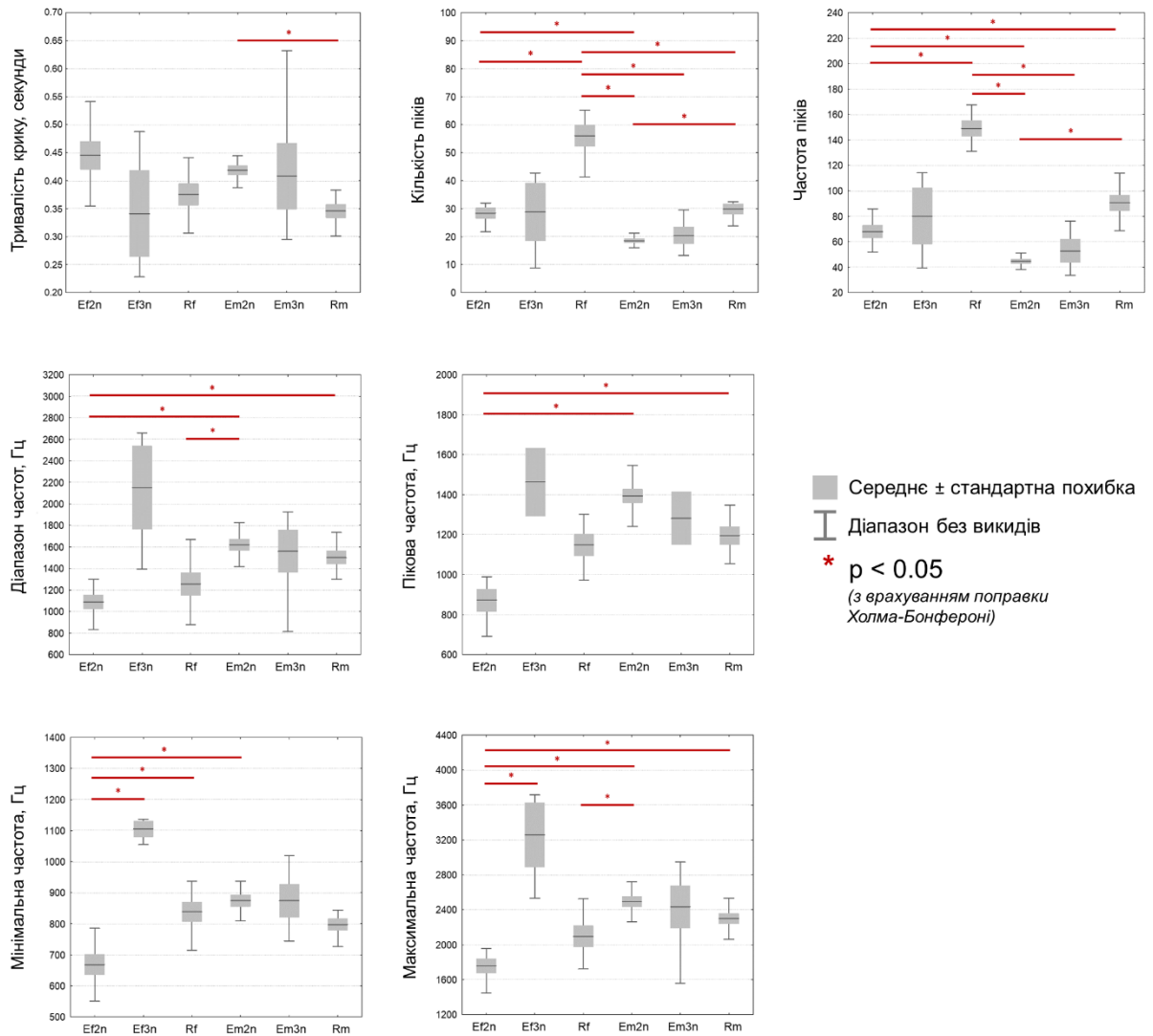


Рис. 3.5. Середні значення трьох часових і чотирьох частотних характеристик криків вивільнення: Ef 2n – *P. esculentus* диплоїдні самиці, Em 2n – *P. esculentus* диплоїдні самці, Ef 3n – *P. esculentus* триплоїдні самиці, Em 3n – *P. esculentus* триплоїдні самці, Rf – *P. ridibundus* самиці, Rm – *P. ridibundus* самці.

Отримані значення тривалості криків у самців були нижчі, ніж значення, опубліковані раніше (Zamfirescu, 2002b): $0,42 \pm 0,071$ vs. $0,48 \pm 0,119$ у *P. esculentus* ($p=0,0154$) та $0,34 \pm 0,079$ vs. $0,45 \pm 0,051$ у *P. ridibundus* ($p < 0,0001$).

Статичні параметри вважаються більш видоспецифічними за динамічні (Gerhardt, 1991). У багатьох видів амфібій тривалість крику та пікова частота є статичними параметрами (Castellano & Rosso, 2006; Gerhardt, 1991). В

нашому аналізі всі сім вимірних параметрів криків вивільнення виявилися динамічними зі значеннями CV більше 10% (Таблиця 3.5). Лише у триплоїдних гібридів пікова та мінімальна частоти були оцінені як статичні параметри, що скоріше за все спричинене низькою кількістю особин у вибірці. В цілому серед самиць спостерігалася тенденція до більш високих CV, але різниця між самцями та самицями виявилася незначущою ($KW-H(5;42) = 1.7675; p = 0.8803$).

Таблиця 3.5

Коефіцієнти варіації (CV) трьох часових і чотирьох частотних параметрів криків вивільнення розраховані для шести груп жаб роду *Pelophylax*. Сіра заливка – $CV \leq 5\%$. $CV = SD * 100 / \text{середнє}$.

	Тривалість крику	Пікова частота	Діапазон частот	Мінімальна частота	Максимальна частота	Кількість піків	Частота піків
Em 2n	16.92	24.64	27.66	18.25	20.31	32.75	31.40
Ef 2n	29.62	28.68	32.09	25.80	24.19	34.20	37.71
Em 3n	32.29	5.03	28.11	13.57	22.19	32.31	38.81
Ef 3n	38.96	2.35	31.07	4.01	19.53	61.80	47.39
Rm	22.97	21.73	26.83	15.44	17.10	40.16	44.06
Rf	27.91	24.22	45.98	20.80	31.93	37.09	22.14

Статистично значуща кореляція між піковою частотою та розміром тіла показана для самиць *P. esculentus* ($r = -0,87, p = 0,0002$), самиць *P. ridibundus* ($r = -0,72, p = 0,0002$) та самців *P. ridibundus* ($r = -0,73, p = 0,035$), але не самців *P. esculentus* ($r = -0,17, p = 0,2522$) (Рис 3.6). Однак, рівень значущості для самців *P. ridibundus* був відносно низьким, що може бути наслідком низької кількості особин включених в аналіз. Висока кореляція також була показана між розміром тіла та мінімальною частотою ($p < 0,001$) для *P. esculentus* обох статей та самиць *P. ridibundus*, але не самців *P. ridibundus* ($p = 0,3854$). Подібна кореляція може пояснити, чому триплоїдні самиці так сильно відрізнялися від

інших груп за частотними параметрами: всі три триплоїдні самиці мали відносно малий розмір тіла, а відповідно, високі значення частотних параметрів. Кореляція між розмірами тіла та іншими параметрами криків вивільнення не була виявлена.

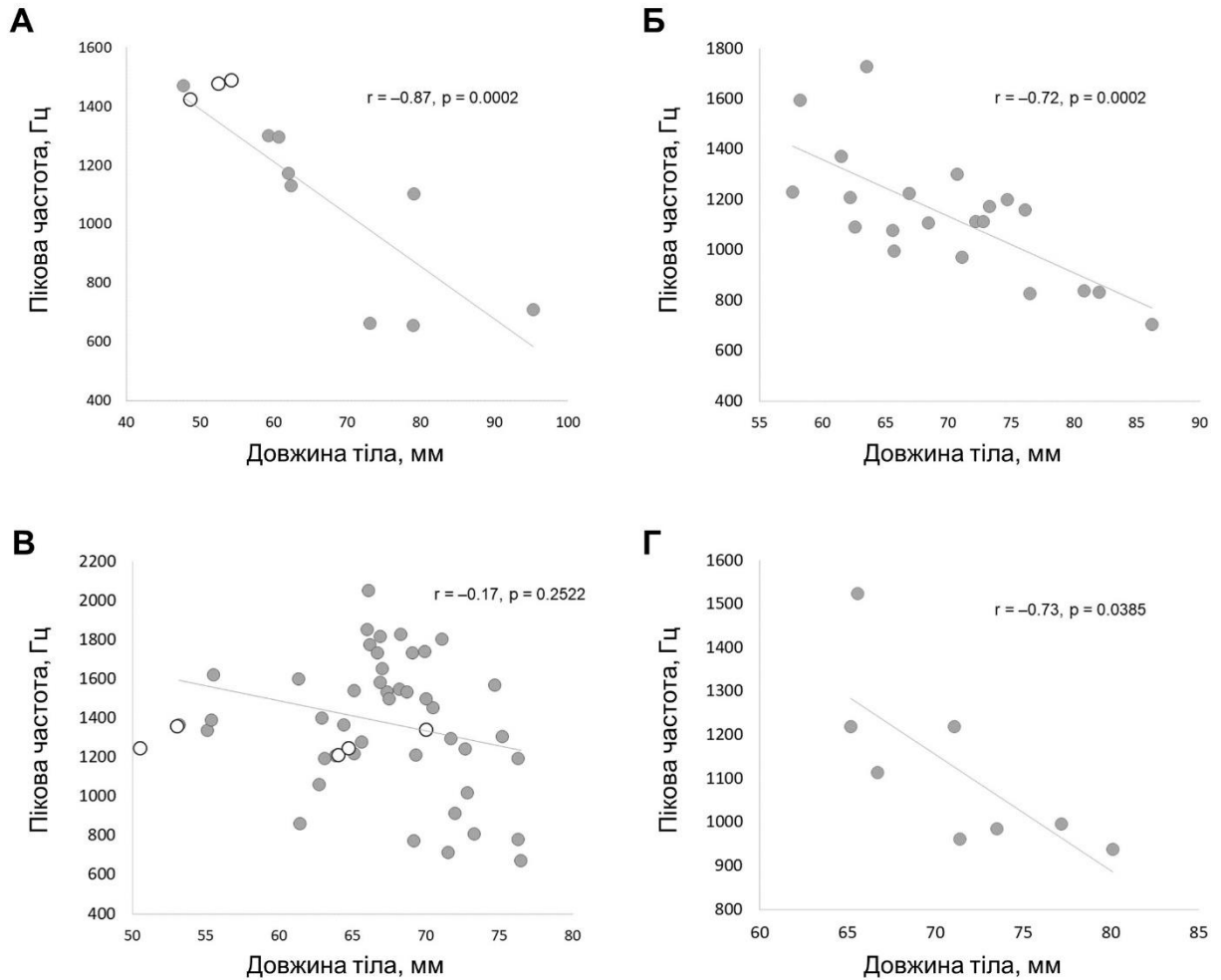


Рис. 3.6. Кореляції між піковою частотою та довжиною тіла: А – самиці *P. esculentus* (сірі точки – диплоїди, білі точки – триплоїди), Б – самиці *P. ridibundus*, В – самці *P. esculentus* (сірі точки – диплоїди, білі точки – триплоїди), Г – самці *P. ridibundus*.

Результати кореляційного аналізу співвідносяться з результатами досліджень інших груп безхвостих амфібій (Davies & Halliday, 1978; Gingras et al., 2013).

Гібриди безхвостих амфібій зазвичай мають проміжні характеристики співів в порівнянні з батьківськими видами (Gerhardt, 1974; Gerhardt et al., 1980; Mable & Vogart, 1991; Roberts, 2010). Більш того. Для *Pelophylax esculentus* complex було показано «ефект дозування геному» для шлюбних співів самців: виміряні параметри мали тенденцію до збільшення, чи зменшення в залежності від того, скільки геномів L чи R мали досліджувані особини (Hoffmann & Reyer, 2013). Аналізуючи крики вивільнення, ми показали різницю між всіма досліджуваними групами зелених жаб (самці та самиці, *P. esculentus* та *P. ridibundus*), хоча ця різниця і виявилась неоднозначною. Однак, ми і не мали б очікувати чітку різницю між криками вивільнення *P. esculentus* та *P. ridibundus*, оскільки *P. esculentus* є гібридом і його характеристики можуть частково перекриватися з характеристиками батьківського виду. Оскільки для шлюбних співів жаб *Pelophylax esculentus* complex було показано різницю в залежності від типу ГПС, з якої вони походять (Hoffmann & Reyer, 2013), ми не стали включати в даний аналіз другий батьківський від *P. lessonae*, який відсутній в Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб.

Таким чином, отримані результати показують, що крики вивільнення не можуть слугувати видоспецифічним маркером для визначення таксономічної приналежності різних видів зелених жаб роду *Pelophylax*.

3.2. Новий метод прижиттєвого визначення плоідності пуголоків

Оскільки для пуголоків неможливо визначити плоідність за розміром еритроцитів, ми розробили методику прижиттєвого отримання хромосомних препаратів з регенерату хвостового плавця (Pustovalova, Fedorova & Shabanov, 2022).

Схематичний протокол отримання хромосомних препаратів з регенерату хвостового плавця пуголоків, а також його порівняння з протоколами для отримання хромосомних препаратів з кишківника та зябра, представлений на Рис. 3.7.

Шість пуголоків були отримані від лабораторного схрещування самиці *P. esculentus* (Нижній Добрицький став, Харківська область, Україна, 49.55, 36.30) та самця *P. ridibundus* (озеро Пісочне, Волинська область, Україна, 51.56, 23.91).

Тканина	Кишківник	Зябра	Регенерат хвостового плавця
Отримання тканини	1. Препарувати пуголка з вентральної сторони 2. Вирізати весь кишківник 3. Очистити кишківник від залишків травлення	1. Препарувати пуголка з вентральної сторони 2. Вирізати зябра	1. Відрізати 1/3 хвостового плавця 2. Зачекати на регенерацію тканини 1 тиждень 3. Відрізати регеновану тканину
Обробка колхіцином	12-14 години (помістити цілого пуголка в розчин колхіцину перед отриманням тканини)	12-14 години (помістити цілого пуголка в розчин колхіцину перед отриманням тканини)	4 години (інкубувати в колхіцині відрізану регеновану тканину)
Інкубація в гіпотонічному розчині	20 хв	20 хв	20 хв
Фіксація в розчині Карнуа	30 хв	30 хв (після замінити фіксатор на свіжий)	30 хв (після замінити фіксатор на свіжий)
Центрифугування	250 g, 5 хв	–	–

70% оцтова кислота

↓

Помітити 3 краплі на предметне скло нагріте до 60°C

↓

Висушувати при 60°C протягом 1,5-2 годин

Рис. 3.7. Схематичний протокол отримання препаратів мітотичних хромосом оптимізований для різних типів тканин пуголоків

Пуголовків на стадії розвитку від 28 до 33 анестезували, обробляючи 2% розчином лідокаїну (локальний анестетик, який блокує натрієві канали, знижуючи таким чином больову чутливість) та відрізали 1/3 дистальної частини хвостового плавця.

Для того, щоб пуголовок міг ефективно пересуватися і харчуватися, необхідно відрізати не більше ніж 1/3 хвостового плавця. Регенерація потребує відновлення значної частини тканини, тому займає 1 тиждень. Невелику частину регенерованої тканини можна отримати і раніше, однак її об'єму недостатньо для отримання достатньої кількості хромосомних пластинок. Ефективність двотижневої регенерації також була проаналізована, однак в цьому випадку не було знайдено жодних хромосомних пластинок на препаратах.

Регенеровану тканину хвостового плавця (Рис. 3.8) відрізали і переносили в 0.4% розчин колхіцину на 1, 2, 3, 4, 5 і 6 годин для перевірки того, який час інкубації в колхіцині є найбільш ефективним. Далі тканину переносили у гіпотонічний розчин 0,07М КСІ на 20 хвилин, і після фіксували у розчині Карнуа.



Рис. 3.8. Пуголовок з регенерованою тканиною хвостового плавця.

Для отримання хромосомних препаратів маленькі шматки (приблизно 2мм²) регенерованої тканини гомогенізували в 100 мкл 70% оцтової кислоти. Після гомогенізації три краплі отриманої клітинної суспензії (кожна крапля – 50 μл) переносили на предметне скло нагріте до 60°C. Нагрівання предметного скла не є обов'язковим, однак воно пришвидшує висихання препарату і запобігає формуванню кристалів оцтової кислоти.

Залишки тканини можуть зберігатися протягом довгого часу (місяці і роки) в фіксаторі Карнуа при температурі +4°C, або при кімнатній температурі протягом коротшого часу (дні або тижні). При цьому важливо слідкувати за рівнем фіксатора, який може випаровуватись, і вчасно оновлювати його рівень у пробірці.

Для визначення ефективного часу інкубування ми витримували регенерат хвостового плавця в колхіцині протягом 1, 2, 3, 4, 5 та 6 годин. Після інкубування протягом 1-3 на препаратах не було знайдено жодної хромосомної пластинки. Однак, після інкубування протягом 4-5 годин на препаратах були зафіксовані численні хромосомні пластинки та інтерфазні ядра (Рис. 3.9). Середня кількість хромосомних пластинок в одній краплі клітинної суспензії складала 10.0 ± 5.2 (mean \pm SD).

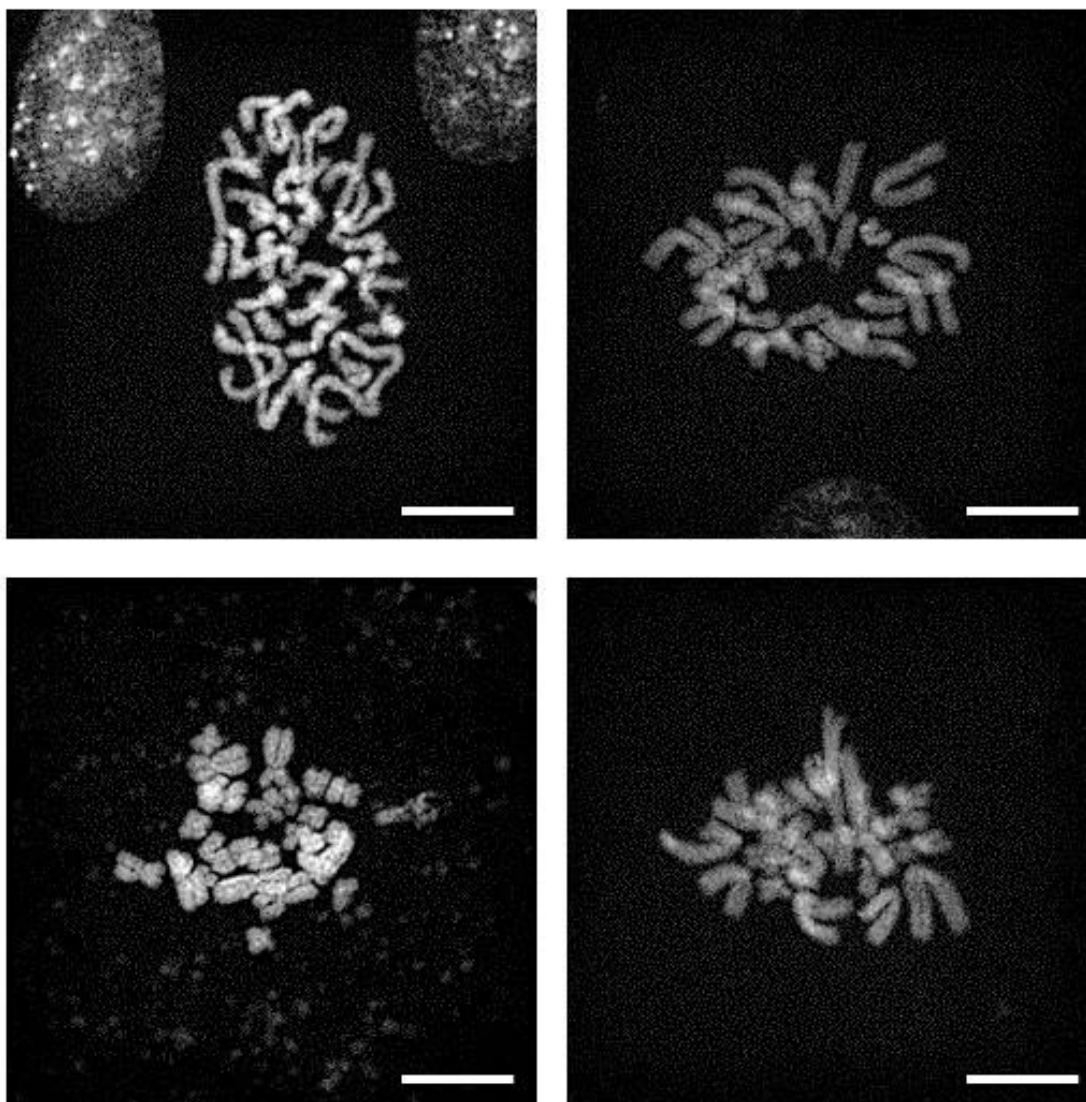


Рис. 3.9. Мітотичні хромосомні пластинки з регеновано хвостового плавця пуголовків. Забарвлення DAPI. Шкала – 10 мкм.

Для оцінки чистоти отриманих препаратів були також проаналізовані препарати з кишківника та зябер пуголовків (Рис. 3.10).

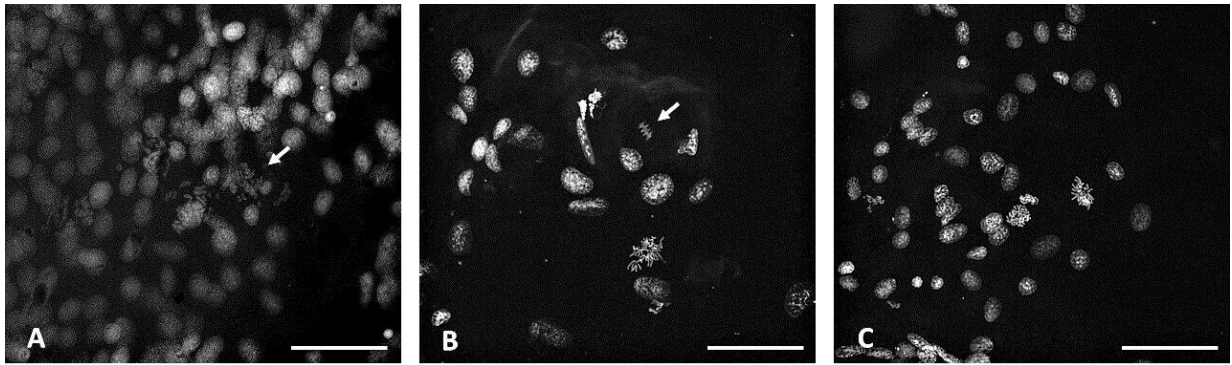


Рис. 3.10. Хромосомні препарати різних тканин пуголовка. А – кишківник, стрілка вказує на мітотичні хромосомні пластинки, перекриті ядрами інших клітин. В – зябра, стрілка вказує на водорості, які забруднюють препарат. С – регенерат хвостового плавця. Забарвлення DAPI. Шкала – 100 мкм.

Різні тканини пуголовків можуть бути використані для приготування хромосомних препаратів, однак кожна з них має свої переваги та недоліки.

Епітелій кишківника легко препарується та надає можливість проаналізувати велику кількість тканини. Середня кількість мітотичних хромосомних пластинок, отриманих з тканин кишківника, складала 5.6 ± 3.6 (mean \pm SD). Однак, використання кишківника вимагає вбивства пуголовка, а також препарати часто є засміченими мікроскопічними водоростями та продуктами травлення (Рис. 3.10).

Використання зябер пуголовків дозволяє зробити чисті препарати зі значною кількістю мітотичних хромосомних пластинок, однак все ще потребує вбивства тварини. Маленький розмір зябер та компактність їх тканини призводить до того, що їх складно препарувати та мацерувати. Середня кількість мітотичних хромосомних пластинок, отриманих із зябер, складала 9.8 ± 2.5 (mean \pm SD).

Використання регенерату хвостового плавця дозволяє уникнути необхідності вбивати пуголовка, а також отримати чисту тканину, що активно проліферує. Регенерована тканина майже повністю прозора (Рис. 3.8) та не

містить меланофорів і внутрішньо-епідермальних пігментів, які зазвичай присутні в хвостових плавцях пуголовків.

Після відрізання регенерованої тканини пуголовки можуть регенерувати знову та бути дорощеними до статевої зрілості і використані для подальших досліджень. Якщо пуголовки були отримані з природи, вони можуть бути випущеними назад до своїх природних локалітетів. В даному випадку необхідно вживати міри для запобігання занесенню з лабораторних умов хворіб до природньої популяції. Однак, випускання в природу пуголовків, які отримані шляхом штучного схрещування, є незаконним в багатьох країнах і вкрай безвідповідальним через ризик генетичного забруднення.

Запропонований метод отримання хромосомних препаратів з регенерату хвостового плавця має лише два недоліки. По-перше, регенерація займає час, що передбачає утримання пуголовків в лабораторних умовах і вимагає ретельного догляду за ними. По-друге, при використанні даного методу неможливо визначити стать пуголовка, оскільки до настання статевої зрілості розрізнення самців та самиць зелених жаб можливе лише за аналізом морфології гонад при розтині. Також досі не існує надійного методу розрізнення статевих хромосом зелених жаб, оскільки вони є гомоморфними (Heppich, 1978).

Таким чином, запропонований метод є зручним для отримання хромосомних препаратів пуголовків, які знаходяться на ранніх стадіях розвитку, оскільки в цей момент вони мають вищий регенераційний потенціал, а також на ранніх стадіях мають недиференційовані гонади, тому не потребують розтину для визначення статі за морфологією гонад.

3.3. Порівняння різних форм зелених жаб за стійкістю їх розвитку (аномалії розвитку)

Вибірки зелених жаб, які збиралися в Нижньому Добрицькому ставі та в Коряковому ставі в червні-липні 2019-2021 років під кінець нересту, були проаналізовані на наявність аномалій (Таблиця 3.6) (Kryvoltsevych et al., 2022).

Таблиця 3.6

Вибірки зелених жаб з Нижнього Добрицького та Корякова ставу за 2019-2021 роки

Рік	Локалітет	Вид, стать, плоідність									Всього
		<i>P. ridibundus</i>			<i>P. esculentus</i>						
		♂	♀	?	♂		♀		?		
		2n			2n	3n	2n	3n	2n	3n	
2019	Добрицький	6	3	3	46	3	12	2	2	0	77
	Коряків	0	1	0	105	7	7	2	4	1	127
2020	Добрицький	1	3	1	26	3	4	8	0	0	46
	Коряків	0	1	0	19	1	7	1	11	0	40
2021	Добрицький	1	14	1	45	2	3	1	0	0	67
	Коряків	1	0	0	85	12	24	2	0	0	124
Всього	Добрицький	8	20	5	117	8	19	11	2	0	190
	Коряків	1	2	0	209	20	38	5	15	1	291

Всього було ідентифіковано 12 типів аномалій кінцівок, пальців, забарвлення та м'язів у 30 особин з Добрицького ставу та 7 особин з Корякова ставу (Таблиця 3.7). Найчастіше зустрічалися аномалії кінцівок та пальців: брахідактилія (вкорочені пальці за рахунок відсутніх фаланг, Рис. 3.11 Б) у 13 особин з Добрицького ставу, шизодактилія (розгалужені пальці, Рис. 3.11 В) у однієї особини з Добрицького ставу та чотирьох з Корякова ставу, а також аномалії забарвлення (викривлення дорсальної лінії, чорні та сірі плями тощо, Рис. 3.11 З) в чотирьох випадках з Добрицького ставу та один в Коряковому. Загалом, з 37 особин, у яких були зафіксовані аномалії, три самця з Добрицького ставу мали більше ніж одну аномалію. Спільною для цих трьох

особин була брахідактилія, до якої додавалась олігодактилія, м'язова дистрофія або розширена зіниця (Таблиця 3.7).

Цікавою знахідкою був самець з аномальною вокалізацією з Добрицького ставу, який був виловлений у 2020 році. Цей самець не видавав жодного звуку під час штучно індукованого амплексусу (деталі описано в розділі «Біоакустичні методи»). Самець робив всі рухи, необхідні для вокалізації: прокачував повітря з легень через гортань до резонаторів із закритими і далі відкритими ніздрями) (Gans, 1973). Всі інші особини з цієї вибірки мали нормальну вокалізацію і видавали типові крики вивільнення під час імітації амплексусу.

Між двома дослідженими локалітетами різнилися: частоти особин з аномаліями ($p < 0.0001$), частоти аномалій в кожен досліджений рік ($\chi^2 = 6,97$, $p = 0,0306$), а також типи аномалій ($\chi^2 = 24,05$, $p = 0,0125$). Однак, значущої різниці не було знайдено в частках аномалій при порівнянні *P. esculentus* та *P. ridibundus* в кожному зі ставів: $p = 0,1064$ для двох ставів разом ($p = 0,1063$ для Добрицького ставу та $p = 0,7848$ для Корякова ставу). Також не було виявлено різниці в частках аномалій між диплоїдними та триплоїдними гібридами: $p = 0,8433$ для двох ставів разом ($p = 0,3295$ для Добрицького ставу та $p = 0,0903$ для Корякова ставу).

Таблиця 3.7

Аномалії зафіксовані у зелених жаб з двох ставів

Аномалія		Нижній Добрицький став			Всього аномалій, № (%)	Коряків став			Всього аномалій, № (%)
		2019 № (%)	2020 № (%)	2021 № (%)		2019 № (%)	2020 № (%)	2021 № (%)	
Пальці	Брахідактилія	6* (35)	4* (57)	3* (38)	13 (38)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Шизодактилія	1 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	4* (80)	4 (50)
	Синдактилія	1 (6)	0 (0)	1 (13)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Олігодактилія	0 (0)	0 (0)	3* (38)	3 (9)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (13)
	Ектродактилія	3 (18)	0 (0)	1 (13)	4 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Кінцівки	Ектромелія	1 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (13)
	Таумелія	1 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	М'язова дистрофія	3* (18)	0 (0)	0 (0)	3 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Очі	Розширена зіниця	1* (6)	0 (0)	1 (13)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	1* (20)	1 (13)
Пігментація	Забарвлення / візерунок	0 (0)	3 (43)	0 (0)	3 (9)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (13)
Вокалізація	Відсутність голосу	0 (0)	1* (14)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Всього особин з аномаліями, № (%)		16 (100)	7 (100)	8 (100)	34 (100)	2 (100)	0 (100)	5 (100)	8* (100)

* – особини з двома або більше аномаліями одночасно

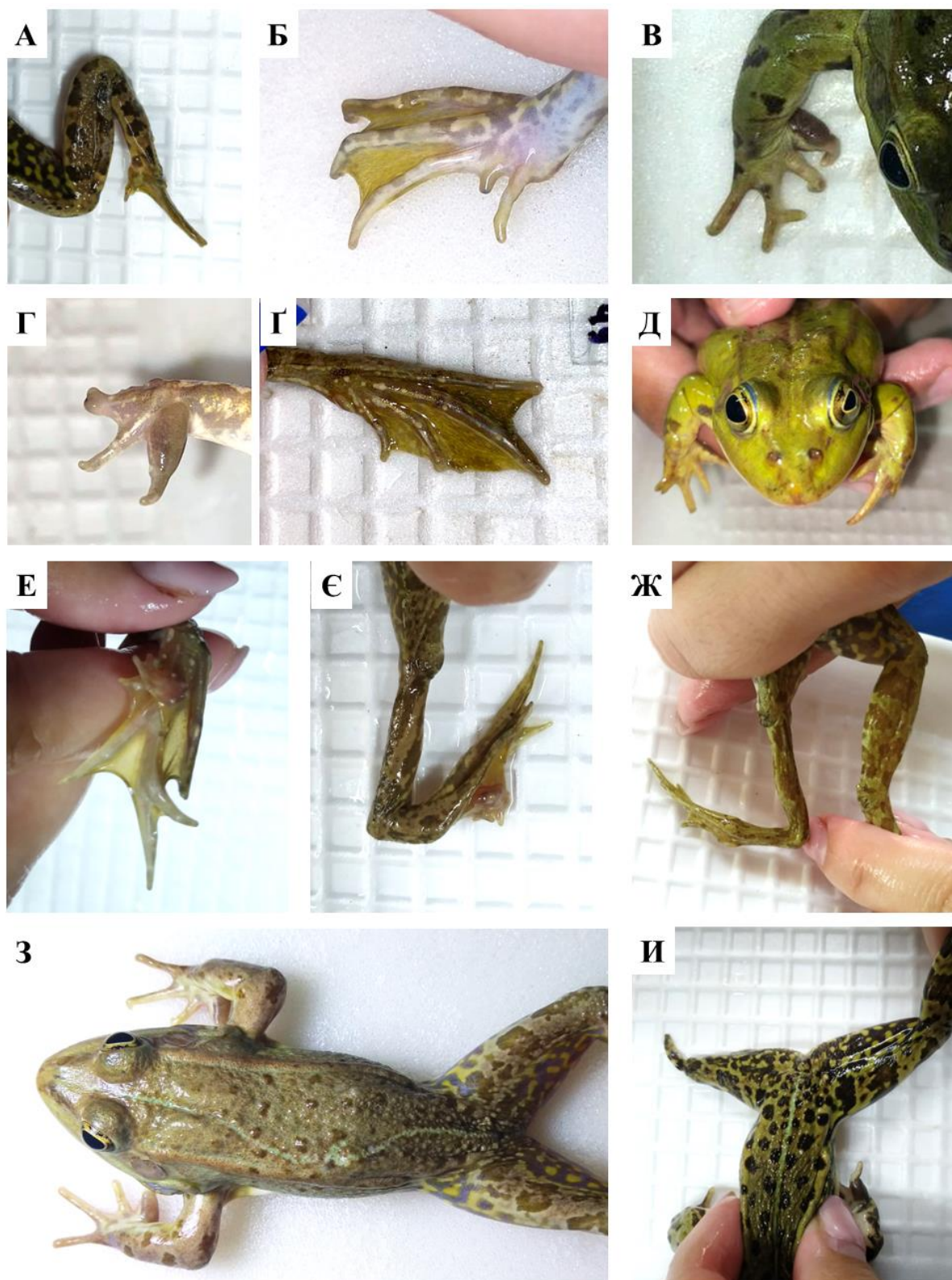


Рис. 3.11. Аномалії, зафіксовані у дорослих зелених жаб *P. ridibundus* та *P. esculentus*. А – ектродактилія, Б – брахідактилія, В, Д – шизодактилія, Г – синдактилія, Г – олігодактилія, Д – розширена зіниця, Е, Є – таумелія, Е, Є, Ж – м'язова дистрофія, З – аномалія візерунку забарвлення (викривлена середня

дорсальна лінія), И – ектромелія. Фото – Федорова А., Пустовалова Е., Верхотурова П., Переславська К., Госткіна Т.

Загалом особини з Добрицького ставу характеризувалися наявністю великої кількості деформацій кісток: переломи, вивихи, крихкість кісток та неправильно зрощені переломи. Більш того, багато жаб з цього ставу мали помітні проблеми з коагуляцією крові: більшість особин, у яких брали зразки крові (з завушної вени або шляхом відрізання фаланги пальця) мали довгу кровотечу та потребували особливої уваги і нагляду після взяття зразка. Жодних проблем з коагуляцією або деформацією кісток не було виявлено у жаб з Корякова ставу. Тому ми припускаємо, що жаби в Добрицькому ставі можуть страждати від нестачі поживних елементів, що призводить до порушень кальцієвого метаболізму та крихкості кісток (Densmore & Green, 2007).

Цікавим в цьому контексті виявляється спостереження зроблене на вибірці ювенілів з Добрицького ставу (Fedorova, Pustovalova & Drohvalenko et al., 2023). У вересні 2018 року ми зібрали вибірку ювенілів для визначення їх плоідності шляхом каріоаналізу (всі виявилися диплоїдами). Після розтину за морфологією гонад було визначено, що серед 21 ювеніла було 13 самиць і 8 самців. Ми не визначали таксономічну приналежність досліджуваних ювенілів, оскільки на цьому етапі розвитку вони ще не мають яскраво виражених морфологічних ознак, які дозволили би відрізнити *P. esculentus* і *P. ridibundus*, як це є можливим для дорослих.

Третина ювенілів (7 особин з 21) в цій вибірці мала серйозні аномалії кінцівок. У п'яти особин були відсутні дистальні елементи кінцівки (ектромелія, Рис. 3.12), один мав вкорочені кістки (гемімелія, Рис. 3.12), і ще один разом з гемімелією мав також повністю порушений план будови кінцівки (таумелія, Рис. 3.12).



Рис. 3.12. Ювеніли з Нижнього Добрицького ставу з аномаліями кінцівок: ектромелія (А-Г), гемімелія (Д, Е), таумелія (Е).

Наявність аномалій не була асоційована зі статтю особин ($\chi^2 = 0.2074$, $p = 0.6488$). Серед 190 дорослих особин з Добрицького ставу лише дві мали серйозні порушення кінцівок: одна особина з ектромелією і одна з таумелією (Рис. 4.3.1). Частота цих типів аномалій відрізнялася між вибірками дорослих особин та ювенілів ($p < 0.0001$), вказуючи на те, що подібні серйозні аномалії мають впливати на виживання амфібій. Причиною того, що серед ювенілів була велика частка особин з відсутніми чи сильно деформованими кінцівками, можуть бути хижаки. Ballengée та Sessions (2009) показали, що найбільш вірогідною причиною відсутніх кінцівок або сегментів кінцівок є вибіркоче хижацтво з боку німф бабок, які можуть поранити чи навіть повністю відкусити кінцівку пуголовка, що розвивається. Успішність подальшої регенерації, а відповідно і ступінь деформації кінцівки залежить від стадії розвитку пуголовка, на якому він отримав поранення. Чим молодше пуголовок, тим більше шансів повністю регенерувати кінцівку. Локальне виникнення цього феномену може вказувати також на зв'язок з генетичними особливостями складної ГПС Добрицького ставу.

Базуючись на умовах характерних для двох проаналізованих локалітетів, ми очікували що жаби в Коряковому ставі будуть піддаватися впливу більшої кількості факторів, які можуть порушувати онтогенез, ніж жаби в Добрицькому ставі. Коряків став знаходиться на межі природоохоронної території національного парку «Гомільшанські ліси» та сільськогосподарських угідь. Над ставом знаходяться поле та автомобільна дорога, тому добрива, пестициди та інші забруднювачі можуть потрапити у воду. Поверхня Корякова ставу вкрита водними рослинами (Рис. 3.13 А), здебільшого ряскою роду *Letna* та ряскою багатокореневою (*Spirodella polyrhiza*), що може пояснюватися забрудненням ставу добривами. З іншого боку, Добрицький став має чисте водне дзеркало (Рис. 3.13 Б) та розташований у найбільш захищеній частині національного парку, а навколишні території у водозбірній площі зайняті дубовими (*Quercus* sp.) гаями. Подібна різниця в умовах передбачає, що Коряків став є більш сприятливим для розвитку паразитичної фауни та мікобіоти, яка може підвищувати частоту аномалій у амфібій (Johnson et al., 2001, 2002; Sessions & Ruth, 1990; Stopper et al., 2002). Але оскільки в Добрицькому ставі було виявлено суттєво більше аномалій, ніж у Коряковому, очевидно, інші фактори мають сильніший вплив на розвиток амфібій.



Рис. 3.13. Досліджувані локалітети: А – Коряків став, Б – Нижній Добрицький став.

Зазвичай дуже складно визначити причини кожної конкретної аномалії, і більшість аномалій мають розглядатися як продукт синергічних ефектів в

кожному окремому середовищі (Marushchak et al., 2021). Різноманіття і частоти аномалій можуть слугувати підказкою для кращого розуміння особливостей розвитку видів, а також їх адаптивного і еволюційного потенціалу.

3.4. Розмір еритроцитів для оцінки плоїдності

3.4.1. Ефективність вимірювання розмірів еритроцитів для визначення плоїдності гібридів

Для аналізу того, наскільки точно розмір еритроцитів та їх ядер відображає плоїдність гібридів, ми об'єднали дві вибірки з різних локалітетів і загалом проаналізували 62 особини, з яких 27 були диплоїдними *P. esculentus* (група "LR"), 19 були триплоїдними *P. esculentus* (група "LLR/LRR") і 16 були *P. ridibundus* (група "RR") (Таблиця 3.8).

Таблиця 3.8

Чисельність вибірок зелених жаб використаних для вимірювання розмірів еритроцитів та їх ядер

Локалітет	LLR/LRR	LR	RR
Нижній Добрицький став	12	10	15
Іськів став	7	17	1

Для кожної особини ми робили сухі мазки крові на яких вимірювали довжину еритроцитів, що найчастіше використовується для визначення плоїдності, площу еритроцитів, а також площу ядра еритроцитів, яка має більш точно відображати кількість ДНК в клітині (детально методика описана в розділі «Матеріали і методи»). Плоїдність різних особин визначали одним з чотирьох точних методів або їх комбінацією: каріоаналізом, аналізом мікросателітних послідовностей, аналізом однонуклеотидних поліморфізмів гену *uqcrfs1* та проточною ДНК цитометрією (детально див. в розділі «Матеріали і методи»).

Прийнятою межею між довжиною диплоїдних і триплоїдних еритроцитів гібридів є 26-28 мкм. В досліджуваній вибірці лише 53% триплоїдних особин

(10 особин з 19) мали довжину еритроцитів більшу за 28 мкм, що дозволило би надійно визначити їх як триплоїдів. Детальна інформація про розмірні характеристики еритроцитів досліджуваних груп жаб представлена в Таблиці 3.9 та Додатку 4.

Таблиця 3.9

Розмірні характеристики досліджуваних жаб та їх еритроцитів

		LLR/LRR	LR	RR
Довжина тіла (SVL), мм	Медіана (IQR)	68.20 (61.32; 82.17)	68.70 (59.34; 73.47)	65.87 (54.13; 76.31)
	Мінімум-максимум	54.10 – 100.35	53.70 – 79.86	40.24 – 90.81
Довжина еритроцита, мкм	Медіана (IQR)	28.07 (26.64; 29.11)	22.49 (21.88; 23.17)	22.43 (21.98; 23.11)
	Мінімум-максимум	21.67 – 30.36	20.65 – 27.15	19.63 – 24.91
Площа еритроцита, мкм ²	Медіана (IQR)	338.31 (311.08; 381.46)	253.12 (234.87; 272.97)	244.77 (225.82; 258.60)
	Мінімум-максимум	235.80 – 461.45	210.19 – 362.46	190.90 – 298.44
Площа ядра, мкм ²	Медіана (IQR)	49.07 (42.85; 55.18)	34.16 (32.01; 40.84)	44.84 (35.60; 47.81)
	Мінімум-максимум	28.60 – 71.28	27.32 – 56.68	29.46 – 51.46
Ядерно-клітинне співвідношення	Медіана (IQR)	0.14 (0.13; 0.15)	0.14 (0.13; 0.16)	0.18 (0.15; 0.19)
	Мінімум-максимум	0.12 – 0.19	0.11 – 0.19	0.13 – 0.22

Для багатьох організмів було показано, що хоча плоідність і впливає на розміри клітини та субклітинних структур (в тому числі на розміри ядра), співвідношення розмірів ядра та клітини залишаються незмінними у організмів з різною плоідністю (Hertwig, 1903). Таке незмінне співвідношення було показано для різноманітних організмів, від одноклітинних дріжджів та інфузорій, і до клітин у багато клітинних тварин та рослин (Conklin, 1912;

Edens et al., 2013; Gregory, 2005; Hara & Kimura, 2009; Jorgensen et al., 2007; Levy & Heald, 2010, 2016; Neumann & Nurse, 2007). Тому ми розраховували ядерно-клітинне співвідношення для кожної з досліджуваних трьох груп зелених жаб (Таблиця 3.9). Даний показник не відрізнявся між трьома групами (Рис. 3.14).

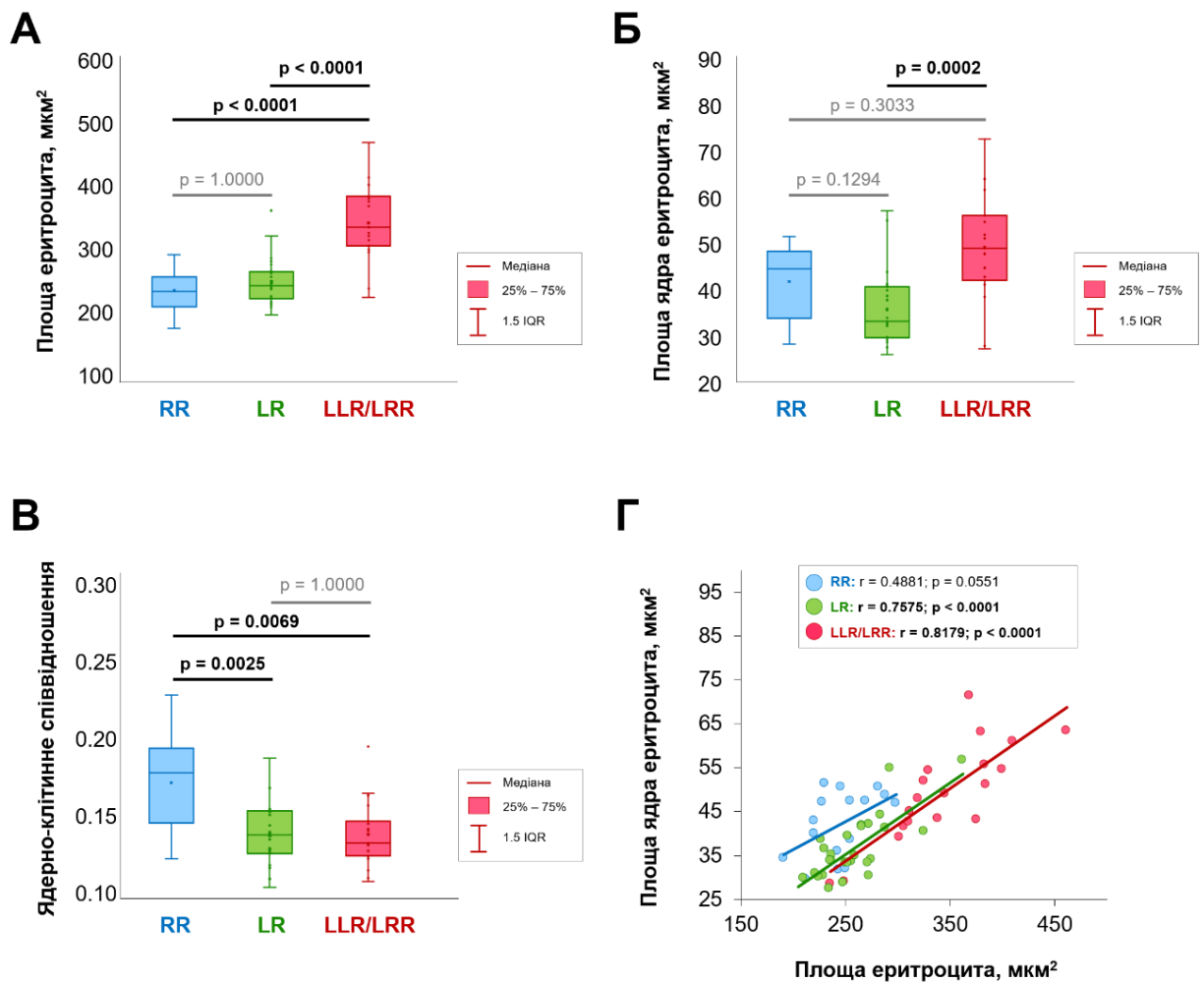


Рис. 3.14. Порівняння трьох груп жаб за площею еритроцитів (А), площею ядра еритроцитів (Б), ядерно-клітинним співвідношенням (В) та кореляція між площею еритроцитів та площею ядер еритроцитів (Г)

Оскільки для багатьох організмів показано, що вищий вміст ДНК в ядрі клітини, призводить до збільшення не тільки розмірів клітин, а також органів і навіть всього організму (Fankhauser, 1945; Melaragno et al., 1993; Yu et al., 2010), ми також вимірювали довжину тіла (SVL) кожної особини. Результати

аналізу Краскела-Волліса показали, що три досліджувані групи жаб не відрізнялися між собою за розмірами тіла ($H(2) = 1,088$; $p = 0,5804$; Рис. 3.15 А).

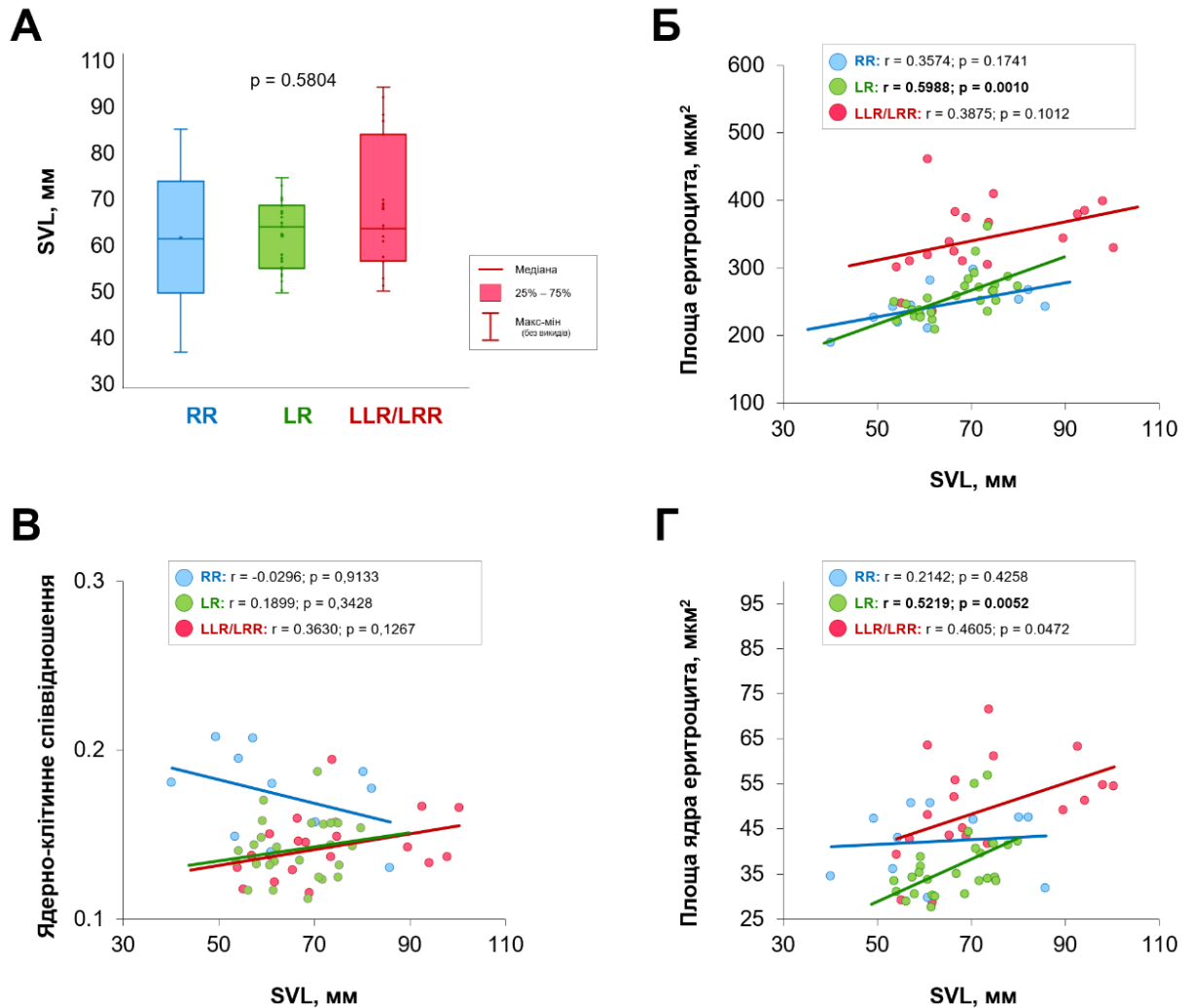


Рис. 3.15. Порівняння трьох груп жаб за розмірами тіла (А) і кореляція розмірів тіла з площею еритроцитів (Б), ядерно-клітинним співвідношенням еритроцитів (В) та площею ядра еритроцитів (Г).

Результати кореляційного аналізу показали, що помірна кореляція між розмірами тіла жаб і площею клітин (Рис. 3.15 Б) та площею ядер еритроцитів (Рис. 3.15 Г) спостерігалась тільки для диплоїдних гібридів, але не для інших груп (Рис. 3.15 Б, В, Г).

Таким чином, хоча даний метод вимірювання розмірів еритроцитів та/або їх ядер не дозволяє встановити справжню частку триплоїдів, показуючи зазвичай нижчу частку, він може використовуватися для первинної детекції наявності триплоїдних гібридів в популяційній системі, оскільки особини зі значно великими клітинами та ядрами точно є триплоїдами.

3.4.2. Використання цитометрії еритроцитів для фіксування наявності триплоїдів в ГПС

Ми використали метод вимірювання розмірів еритроцитів для того, щоб вперше зафіксувати наявність триплоїдних гібридів *P. esculentus* в Чорнобильській зоні відчуження (Drohvalenko & Fedorova, 2022). Попередні дослідження зелених жаб на цих територіях проводились ще у 1990-х роках, і всі досліджені жаби були диплоїдними, томи довгий час вважалося, що там існують тільки диплоїдні ГПС (Vinogradov & Chubinishvili, 1999).

Ми збирали вибірку зелених жаб протягом 09–12 серпня 2021 року у співпраці і з офіційним дозволом від Чорнобильського радіаційно-екологічного біосферного заповідника.

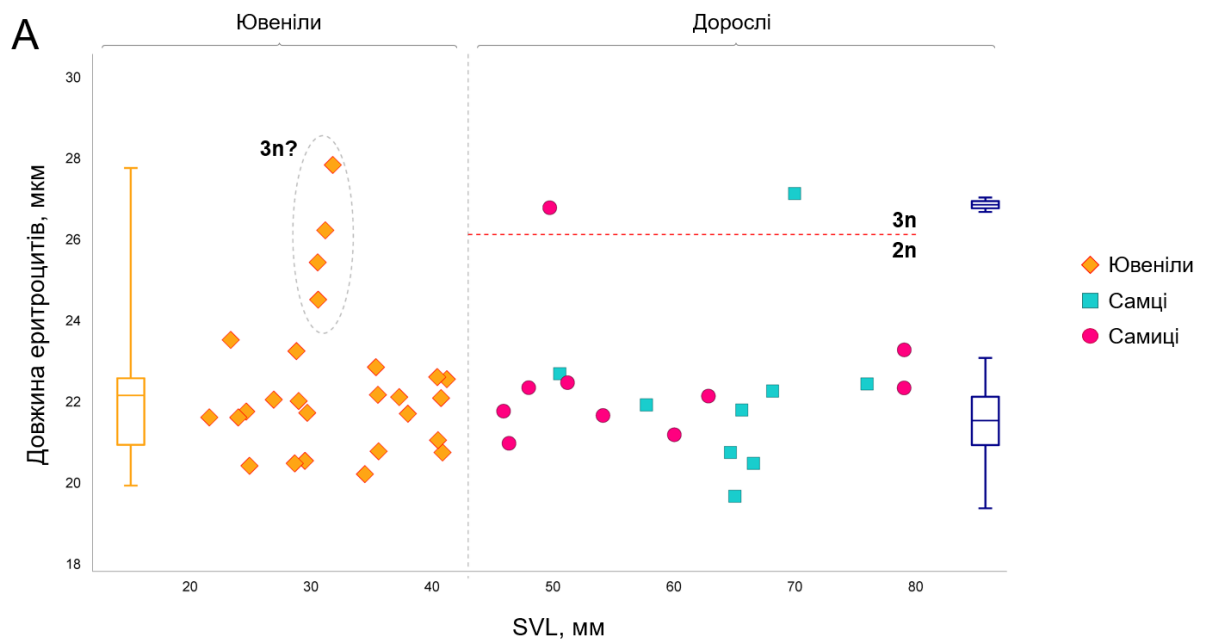
Територія досліджень включала: ріку Прип'ять (в м. Чорнобиль; 51.2724, 30.2448) та її пойму (51.3414, 30.1991), ріку Уж (51.2738, 29.7418) та її пойму (51.2567, 30.222), ізольовані старі меліоративні канали (51.2455, 30.1697) та меліоративні канали в долині річки Ілля (51.2780, 29.8081) та обвідний канал ставка-охолоджувача Чорнобильської атомної електростанції (51.3968, 30.1418).

Загалом було відловлено 52 особини: 1 пуголовок (на пізній стадії розвитку), 31 ювеніл, та 19 дорослих (10 самиць і 9 самців). За морфологічними ознаками, а також біоакустичним критерієм (шлюбні співи) ми зафіксували L-E-R-ГПС в обвідному каналі ставка охолоджувача. Однак, не для всіх особин ми могли точно визначити видову приналежність за морфологічними ознаками, тому точну кількість батьківських видів та

гібридів у вибірці не наводимо. Також, оскільки для ювенілів часто складно визначити стать за зовнішніми морфологічними ознаками, ми розглядали їх як гомогенну групу, не поділяючи на самців та самиць.

Розподіл проаналізованих особин за SVL та довжиною еритроцитів показано на Рис. 3.16. Всі дорослі особини візуально поділялися на дві чіткі групи за розміром еритроцитів. Більшість дорослих особин (з середнім значенням довжини еритроцитів 21,54 мкм) ми розглядали як диплоїдів. Дві особини з суттєво більшими еритроцитами (самець з обвідного каналу і самка з пойми р. Прип'ять з середньою довжиною еритроцитів 27,03 мкм та 26,67 мкм, відповідно), довжина яких перевищувала зафіксовану раніше в літературі межу для поділу на диплоїдів та триплоїдів, ми визначили як потенційних триплоїдів. Хоча межі між особинами з малими та великими клітинами виглядає очевидною, всі відловлені особини в подальшому будуть досліджені більш точними молекулярними методами, а також більша кількість особин з Чорнобильської зони має бути проаналізована цитометрією еритроцитів, щоб встановити, чи є для цих ГПС перекривання розмірів еритроцитів диплоїдів та триплоїдів.

Розподіл довжин еритроцитів серед ювенілів виявився менш очевидним. Оскільки для ювенілів ми спостерігали не розрив, а скоріше безперервний набір довжин клітин від малих до великих, ми не можемо з упевненістю визначити межу між диплоїдами та триплоїдами, тому ми розглядали їх на графіку як одну групу. Варто відзначити, що ювеніл з найбільшими еритроцитами (пунктирний овал на Рис. 3.16, середнє значення 25,87 мкм) походить з обвідного каналу, звідки також походить знайдений нами триплоїдний самець.



Б

	Середнє (95% CI)	Медіана (IQR)	Мінімум	Максимум
Ювеніли	22.16 (21.39, 22.93)	21.81 (20.94, 22.58)	19.94	27.76
Потенційні 2n ювеніли	21.48 (21.03, 21.93)	21.50 (20.59, 21.93)	19.94	23.33
Потенційні 3n ювеніли	25.87 (23.57, 28.17)	25.70 (25.06, 26.52)	24.35	27.75
Дорослі 2n	21.54 (21.06, 22.02)	21.69 (20.93, 22.16)	19.38	23.08
Дорослі 3n	26.86 (24.6, 29.12)	26.86 (26.77, 26.94)	26.68	27.03

Рис. 3.16. А – Розподіл зелених жаб з Чорнобильською зоною за їх середньою довжиною еритроцитів та довжиною тіла (SVL). Червона пунктирна лінія вказує на потенційну межу між дорослими диплоїдами та триплоїдами. Пунктирний овал вказує на потенційних триплоїдів серед ювенілів. Середня лінія боксплотів вказує медіану, коробки – інтерквартильні інтервали (IQRs), вуса – максимальні та мінімальні значення. Б – Вимірні параметри еритроцитів для кожної з досліджуваних груп жаб.

Наявність триплоїдних гібридів в Чорнобильській зоні відчуження свідчить про існування тут більш складних геміклональних популяційних систем, ніж вважалося до цього. Як мінімум L-E-Ep-R-ГПС (система, в якій наявні обидва батьківські види, а також диплоїдні та триплоїдні гібриди) в обвідному каналі ставка-охолоджувача вже є більш складною, ніж більшість складних ГПС, що вивчалися на території України (Hoffmann et al., 2015; Meleshko et al., 2014; Suriadna et al., 2020; Дрогваленко et al., 2017). Відсутність

попередніх даних про наявність триплоїдів в Чорнобильській зоні може пояснюватися вибірками, що були занадто малими для реєстрації малочисельних триплоїдів.

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ГАМЕТОГЕНЕЗУ РІЗНИХ ФОРМ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ

4.1. Аналіз розмірного розподілу сперматозоїдів та визначення плоідності сперми за розміром сперматозоїдів

Для того, щоб визначити, якої плоідності сперматозоїди потенційно продукують самці, ми в першу чергу проаналізували мейотичні хромосомні пластинки з сім'яників 24 самців *P. esculentus* з Нижнього Добрицького ставу (вибірки зібрану у 2016, 2017 та 2020 роках) (Fedorova & Pustovalova, 2021). Всі самці окрім одного були диплоїдами (Таблиця 4.1). Для кожного самця ми порахували кількість повних пластинок (13 унівалентних або бівалентних хромосом), анеуплоїдних пластинок (зазвичай на 1-3 більше або менше, ніж 13 хромосом), а також пластинки з ± 26 бівалентами (Рис. 4.1). Ми не аналізували мітотичні хромосомні пластинки з сім'яників, оскільки неможливо відрізнити мітози соматичних та статевих клітин. В цілому було проаналізовано 1362 мейотичні хромосомні пластинки (~55 пластинок на одну особину).

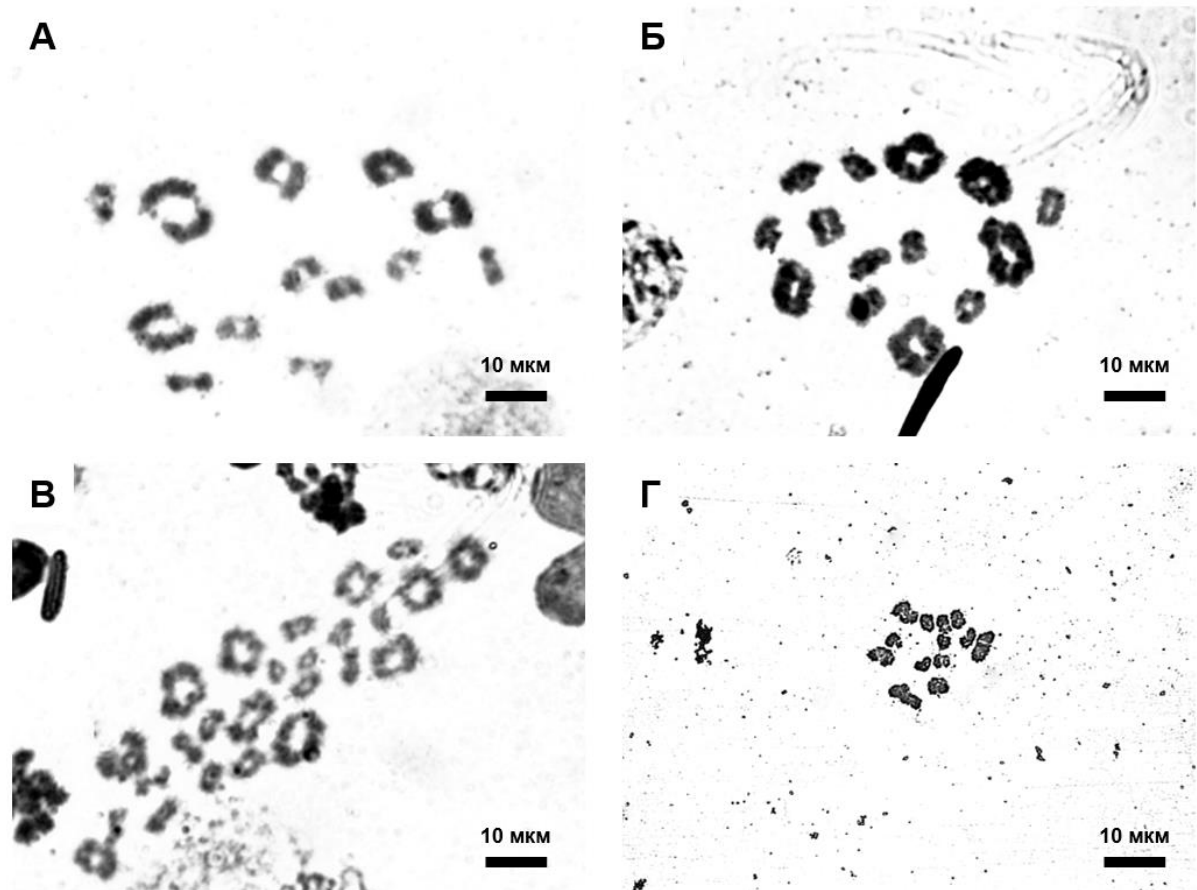


Рис. 4.1. Мейотичні хромосомні пластинки з сім'яників самців *P. esculentus* забарвлені AgNO_3 . А – повна пластинка з 13 бівалентами, Б – анеуплоїдна пластинка, В – пластинка з 26 бівалентами, Г – високо конденсовані хромосоми самця №834 (пояснення в тексті). Фото – Пустовалова Е.

На основі результатів підрахунків мейотичних хромосомних пластинок (Таблиця 4.1) було проведено аналіз головних компонент, завдяки якому ми розділили всіх самців на 5 категорій (Рис. 4.2). До категорії I увійшли самці, у яких більшість мейотичних пластинок мали повний набір унівалентів або бівалентів. До категорії II – самці з рівною кількістю повних та анеуплоїдних пластинок. Самці з категорії III мали здебільшого анеуплоїдні пластинки, а з категорії IV – значну кількість пластинок з ± 26 бівалентів. До категорії V увійшли самці, у яких взагалі не було знайдено мейозів у сім'яниках. Части самців, віднесених до різних категорій відрізнялися між «старою» вибіркою

(2016-2017 рр.) та «ноюю» (2020): $\chi^2 = 6.925$, $p = 0.019$. Більшість самців зловлених у 2020 році потрапили в категорію I.

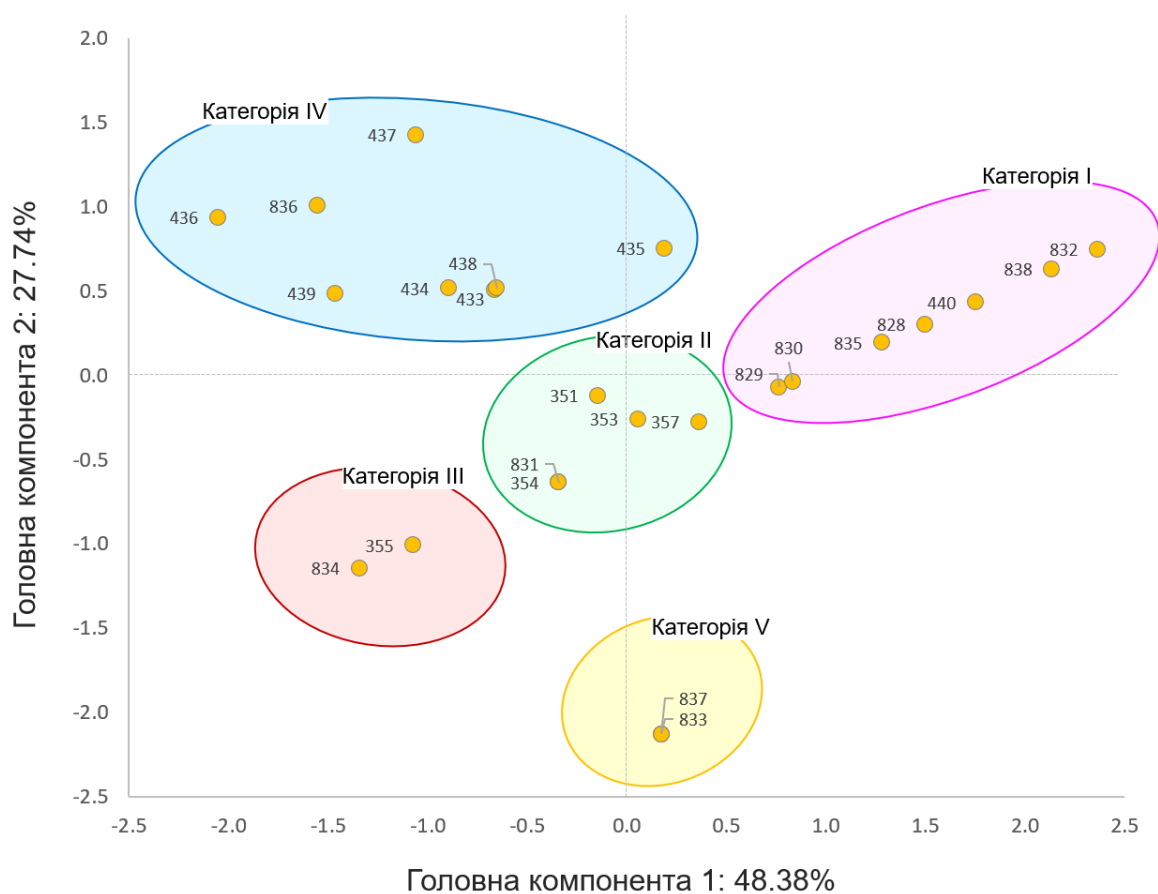


Рис. 4.2. Результати аналізу головних компонент. Категорія I (рожевий) – більшість мейотичних хромосомних пластинок мають повний набір уні- або бівалентів. Категорія II (зелений) – співвідношення повних та анеуплоїдних пластинок близьке до 1:1. Категорія III (червоний) – більшість пластинок є анеуплоїдними. Категорія IV (синій) – значна кількість пластинок з ± 26 бівалентами. Категорія V (жовтий) – жодних мейозів не знайдено.

Для самців з вибірки 2016-2017 років аналізували лише мейотичні пластинки, тоді як у самців зловлених влітку 2020 ми також зібрали зразки уринальної сперми та виміряли довжину голівок сперматозоїдів. Серед 11 проаналізованих самців 10 мали достатню кількість сперматозоїдів для вимірювань (Таблиця 4.1). Один з самців взагалі не мав сперматозоїдів у рідині

отриманій з клоаки. В цілому було зроблено проміри 962 сперматозоїдів від 10 самців *P. esculentus*.

Таблиця 4.1

Характеристика всіх досліджуваних самців *P. esculentus*

Категорія	ID	Плоїдність	SVL, мм	Сім'яники, (лівий; правий), мм	Повні мейотичні пластинки, %	Анеуплоїдні мейотичні пластинки, %	Мейотичні пластинки 26 бівалентами, %	Відносна продуктивність сперми
1	828	2n	73,5	5,6; 5,4	84	16	0	Висока
1	829	2n	73,5	5,7; 4,4	70	30	0	Середня
1	830	2n	69,0	3,8; 3,6	72	28	0	Середня
2	831	2n	71,0	4,7; 4,3	50	50	0	Середня
1	838	2n	70,7	5,7; 5,3	96	4	0	Середня
1	832	2n	75,1	5,6; 5,3	100	0	0	Низька
3	834	2n	71,6	5,2; 5,1	32	68	0	Низька
1	835	3n	67,4	4,4; 4,1	80	20	0	Низька
4	836	2n	74,8	6,1; 3,2	49	51	11	Низька
5	837	2n	70,4	4,6; 4,1	0	0	0	Низька
5	833	2n	73,2	3,0; 3,0	0	0	0	Відсутня
2	351	2n	65,3	4,5; 3,1	59	41	3	-
2	353	2n	67,8	5,2; 4,5	59	41	1	-
2	354	3n	67,7	5,9; 4,5	50	50	0	-
3	355	2n	72,0	5,7; 5,6	37	63	0	-
2	357	2n	70,8	5,2; 4,1	63	37	0	-
4	433	2n	74,4	8,5; 5,9	61	39	8	-
4	434	2n	62,9	4,5; 4,5	58	42	9	-
4	435	2n	67,1	5,2; 5,2	74	26	7	-
4	436	2n	64,7	5,2; 5,2	46	54	17	-
4	437	2n	69,6	5,4; 4,3	67	33	17	-
4	438	2n	73,2	5,4; 4,5	60	40	8	-
4	439	2n	72,9	4,6; 3,6	48	52	11	-
1	440	2n	77,8	7,4; 6,5	89	11	0	-

Для одного з самців була показана умовно висока продуктивність сперми (більше 1000 клітин на краплю клітинної суспензії на препараті), чотири самці мали середню продуктивність (100-1000 клітин) і п'ять мали низьку продуктивність (<100 клітин) (Таблиця 4.1). Чотири з шести самців з категорії I мали високу та середню продуктивність сперми. Також середня продуктивність була відмічена в зразках від самців, що належали до категорій II, IV та V. Не дивлячись на те, що для категорії IV була характерною наявність 26 бівалентів, єдиний самець з цієї категорії, для якого вимірювали довжину

головок сперматозоїдів, мав рівну кількість повних та анеуплоїдних пластинок, що також є характерним для категорії II.

Порівняння довжини головок сперматозоїдів між групами самців з високою, середньою та низькою продуктивністю сперми за допомогою критерію Крускала-Волліса показало, що ці групи відрізняються значуще ($p < 0.0001$). Подальший *post hoc* аналіз показав різницю тільки в парах висока-низька ($p < 0.0001$) та висока-середня продуктивність ($p < 0.0001$), що може бути викликано наявністю лише одного самця, який мав високу продуктивність сперми. Між самцями з середньою та низькою продуктивністю різниця в довжині головок сперматозоїдів не була виявлена ($p = 0.6582$). Можна зробити висновок, що продуктивність самців не пов'язана з розмірами сперматозоїдів, і може викликатися іншими факторами, які потребують додаткових досліджень.

Один самець, який взагалі не мав сперматозоїди в рідині отриманій з клоаки (Таблиця 4.1, самець №833), мав лише декілька мейотичних хромосомних пластинок в сім'яниках. Ці пластинки були поганої якості, через що було неможливо порахувати кількість хромосом. Сім'яники цього самця були незвично малого розміру – обидва по 3 мм в довжину.

Інший самець (Таблиця 4.1, самець №834) мав дуже низьку кількість сперматозоїдів в зразку. Ми не змогли знайти жодної хромосомної пластинки на трьох послідовних препаратах з одного з сім'яників. Тому далі ми розділили другий сім'яник на 4 рівні частини (сегменти пронумеровані випадковим чином) і на чотирьох препаратах з цілого сім'яника змогли зафіксувати достатню для аналізу кількість мейотичних хромосомних пластинок. Кількості хромосомних пластинок не відрізнялися в різних сегментах сім'яника ($\chi^2 = 2,35$, $p = 0,502$). Мейотичні хромосоми даного самця відрізнялися від тих, що ми зазвичай спостерігаємо у самців зелених жаб: вони були сильно сконденсовані, мали круглу форму замість видовженої і візуально не відрізнялися в розмірах між собою (Рис. 4.1). Висока конденсація, низька кількість мейотичних хромосом в одному сім'янику і повна їх відсутність в

іншому у співвідношенні з низькою кількістю сперматозоїдів вказують на стерильність даного самця.

Для кожної з п'яти категорій самців ми проаналізували розподіл розмірів головок сперматозоїдів (Рис. 4.3 А). Самці з категорій I та III мали дуже схожий розподіл з одним піком в районі 11 мкм. Категорія II, в цілому, характеризувалася меншим розміром сперматозоїдів, однак більшим різноманіттям довжин, в той час як самці з категорії IV мали трохи більші сперматозоїди. Категорія V характеризувалася більшою дисперсією з невеликим переважанням клітин розміром 12 мкм.

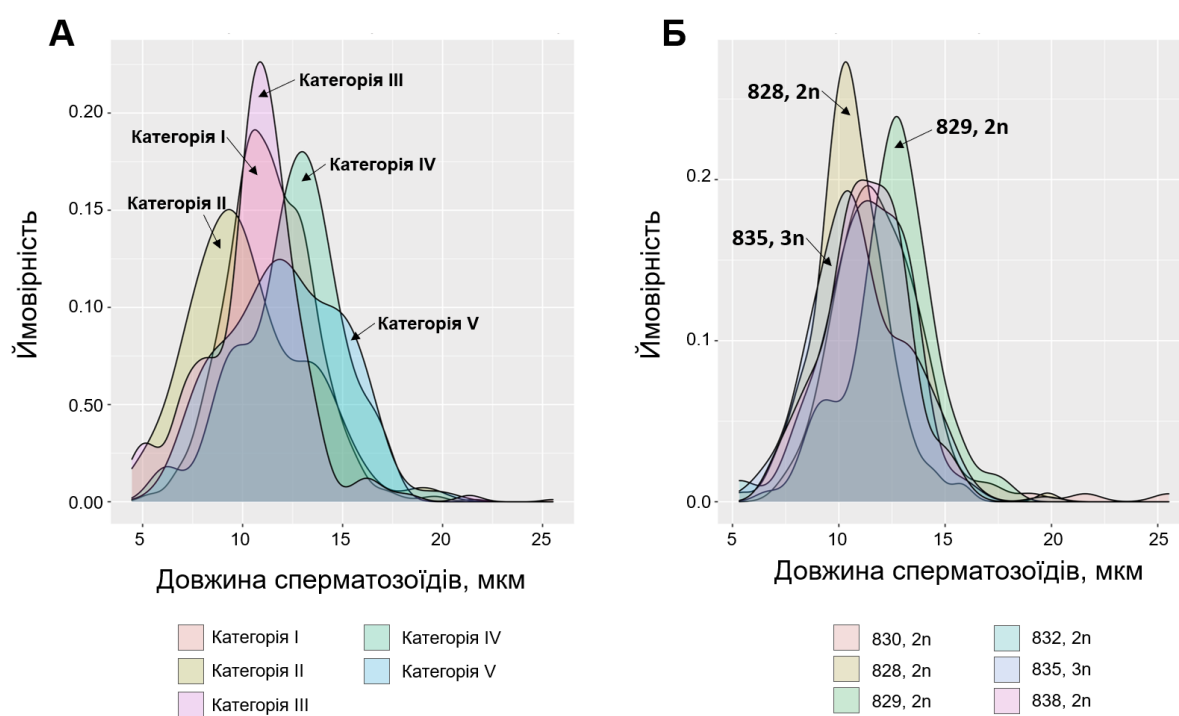


Рис. 4.3. Графіки ймовірності, що описують розподіл довжин головок сперматозоїдів в п'яти категоріях (див. Рис. 5.2) гібридних самців *P. esculentus* (А) та для кожного окремого самця з категорії I (Б).

При детальному аналізі розподілів довжин головок сперматозоїдів кожного самця з категорії I (Рис. 4.3 Б) ми виявили, що три диплоїдні самці (№ 832, 830, 838) мають дуже схожий розподіл, в той час як два інших диплоїдних самця (№ 828, 829) і один триплоїдний (№835) мали помітно більші або менші

сперматозоїди. Той факт, що триплоїдні особини мали схожий розподіл довжин голівок сперматозоїдів, підтверджує припущення про схожий гаметогенез у диплоїдів та триплоїдів (Christiansen & Reyer, 2009). Використання тесту Крускала-Волліса показало наявність різниці між самцями в категорії I ($p < 0,0001$).

Ми припускали, що самець №836, який продукував мейотичні хромосомні пластинки з подвійним набором хромосом (26 бівалентів, Рис. 4.1 В) може формувати диплоїдні гамети. Цей самець (Таблиця 4.1) мав приблизно 11% мейотичних хромосомних пластинок, які містили ± 26 бівалентів. Розподіл довжин голівок сперматозоїдів цього самця був відмінним від нормального (тест Шапіро-Вілка, $p = 0,3047$, Рис. 4.3 А). Однак, медіана довжин була співставна з довжинами сперматозоїдів більшості інших самців, до того ж ми не побачили чіткого біноміального розподілу довжин. Таким чином, ми не можемо стверджувати, що цей самець продукував диплоїдні сперматозоїди.

Отримані результати показують, що кожен самець з дослідженої вибірки має свої власні унікальні особливості сперматогенезу і сперматозоїдів, співвідношення між якими не є очевидним. Ми не знайшли підтвердження того, що довжина голівок сперматозоїдів пов'язана з характеристиками мейотичних хромосом в сім'яниках. Також ми не спостерігали «диплоїдні» сперматозоїди у самця з категорії IV, для якого була характерна наявність 26 бівалентів. Ймовірно, розмір сперматозоїдів визначається не тільки кількістю хромосом в ядрі, а також додатковими факторами, як то конденсація хроматину в ядрі, а також об'ємом, який займають інші органели в клітині.

В цілому, отримані результати означають, що сперматогенез міжвидових геміклональних гібридів має багато ступенів свободи. Таким чином, вимірювання розмірів сперматозоїдів не може бути надійним методом для ідентифікації самців, що потенційно продукують диплоїдні гамети.

4.2. Різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС

Метод визначення геномів за алозимами ЛДГ був використаний для визначення того, які саме гамети передають гібридні самиці з різних ГПС (Fedorova & Shabanov, 2022).

Було зібрано 19 самиць з чотирьох локалітетів з басейну р. Сіверський Донець та двох локалітетів з басейну р. Дніпро влітку 2016-2017 років (Рис 4.4). Визначення таксономічної приналежності та статі проводилось за комплексом морфологічних ознак. Для кожної особини плоідність була визначена за довжиною еритроцитів та підтверджена каріоаналізом.

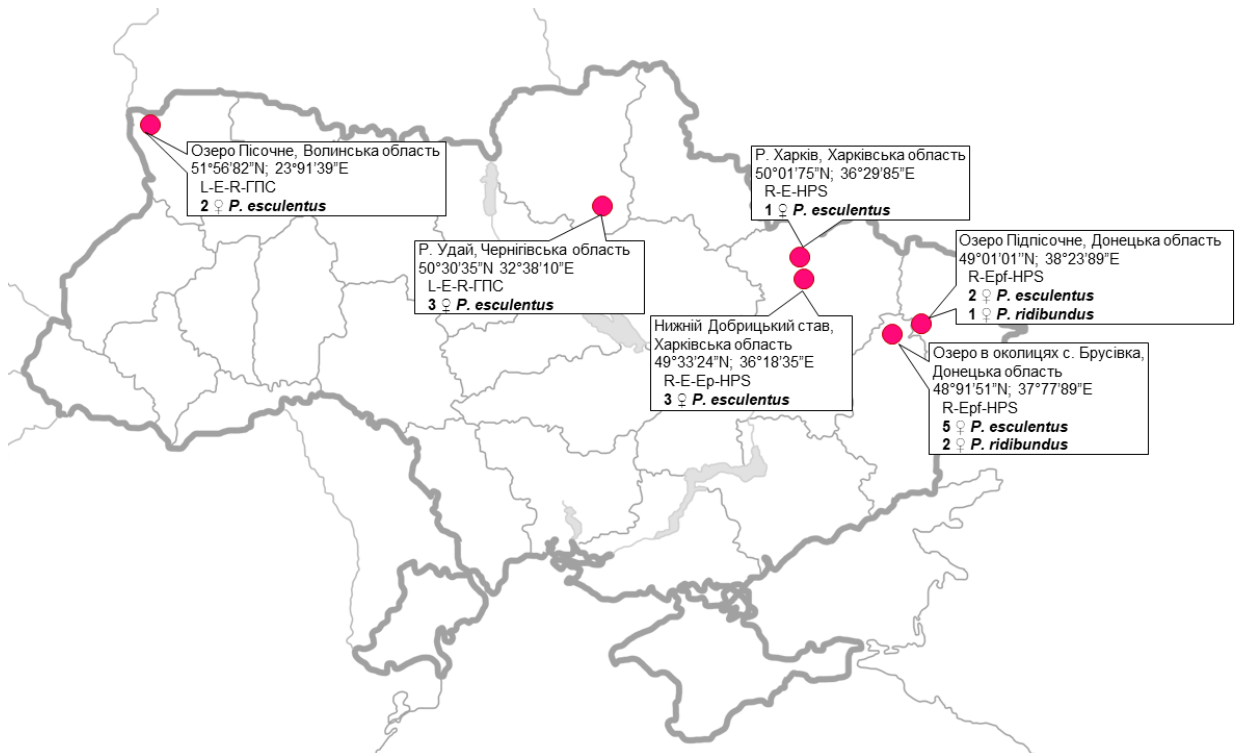


Рис 4.4. Локалітети, типи ГПС та кількість проаналізованих самиць. ГПС – геміклональна популяційна система R – *P. ridibundus*, E – *P. esculentus*, L – *P. lessonae*, p – поліплоїди, f – самиці. Типи ГПС описані в Дрогваленко та ін. 2017 та Шабанов 2015. Мапа – “Map of Ukraine political simple blank”, Sven Teschke, CC BY-SA 3.0.

Серед 16 проаналізованих самиць *P. esculentus* 11 мали L-алозим ЛДГ-1, і відповідно, містили L геном в ооцитах. Інші самиці (5 *P. esculentus* та 3 *P. ridibundus*) мали R-алозим ЛДГ-1, тобто передавали R геном (Таблиця 4.2).

Аналіз ооцитів самиць з басейну р. Дніпро, де розповсюджені L-E-R-ГПС (Suriadna et al., 2020), показав, що вони можуть продукувати гамети з геномами як одного, так і іншого батьківського виду: 3 самиці передавали геном L і 2 самиці передавали геном R (Таблиця 4.2). Отриманий результат співвідноситься з попередніми даними для подібних ГПС, отриманими за допомогою аналізу лампових щіток (Dedukh et al., 2015).

Таблиця 4.2

Характеристика всіх проаналізованих самиць *P. esculentus*.

R – *P. ridibundus*, E – *P. esculentus*, L – *P. lessonae*, p – поліплоїди, f – самиці.

* – самиці з недорозвиненими яєчниками.

№	ГПС	Таксономічна приналежність	Плоїдність	Геном ооцитів	Активність ЛДГ-1, $\mu\text{kat/ml} \times \text{g}$	Інтенсивність забарвлення плями, рх
1	R-Epf	<i>P. ridibundus</i>	2n	R	2,44	55,12
2	R-Epf	<i>P. ridibundus</i>	2n	R	1,79	75,62
3	R-Epf	<i>P. ridibundus</i> *	2n	R	1,31*	59,89
4	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,11	40,56
5	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,66	43,09
6	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,31	59,89
7	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,30	43,70
8	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,40	41,08
9	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	2,76	53,36
10	R-Epf	<i>P. esculentus</i>	3n	L	2,83	45,18
11	R-E	<i>P. esculentus</i>	2n	R	3,18	59,17
12	R-E-Ep	<i>P. esculentus</i>	3n	L	1,03	51,86
13	R-E-Ep	<i>P. esculentus</i> *	3n	R	1,55*	55,45
14	R-E-Ep	<i>P. esculentus</i>	3n	R	2,46	52,34
15	L-E-R	<i>P. esculentus</i>	2n	R	3,16	56,28
16	L-E-R	<i>P. esculentus</i>	2n	L	1,36	41,62
17	L-E-R	<i>P. esculentus</i>	2n	L	2,36	83,14
18	L-E-R	<i>P. esculentus</i>	2n	R	3,4	62,50
19	L-E-R	<i>P. esculentus</i>	2n	L	1,32	55,88

R-Epf-ГПС (описані в Дрогваленко et al., 2017) складається з *P. ridibundus* обох статей, що передають рекомбінантний R геном, та триплоїдних гібридних самиць LLR, що потенційно мали б передавати геном L. Отримані результати підтверджують це припущення: 3 самиці *P. ridibundus* мали R-алозим ЛДГ-1 і, відповідно, передавали R геном, в той час як 7 триплоїдних самиць *P. esculentus* мали L-алозим.

Гаметогенез самиць з R-E-ГПС Харківської області досі не був досліджений на цей момент. За аналогією з L-E-ГПС ми мали б очікувати, що самиці в таких системах будуть передавати L геном в гаметах. В проаналізованій вибірці була лише одна самиця з R-E-ГПС і вона мала R-алозим в ооцитах, тобто передавала R геном. Лише однієї особини недостатньо, щоб робити висновки про характер спадкування в R-E-ГПС. Однак ці дані співвідносяться з даними, отриманими для самців: показано що самці з R-E-ГПС цього регіону передають як L, так і R геноми в сперматозоїдах (Biriuk et al., 2016; Pustovalova et al., 2022). Таким чином, R-E-ГПС є більш складними в порівнянні з L-E-ГПС і потребують подальших детальних досліджень.

Оскільки ЛДГ є одним з ключових ферментів глюкозного метаболізму, ми порівнювали її активність у самиць з різних ГПС і з різними геномами. Результати визначення активності ЛДГ представлені в Таблиці 4.2.

Активність R-алозиму була у 1,66 рази вища за активність L-алозиму ($KW-H(1;19) = 3,9273$; $p = 0,0475$) (Рис. 4.5).

Дві самиці *P. esculentus* з R-E-Epf-ГПС та R-Epf-ГПС, що передавали R геном, мали помітно нижчу активність ЛДГ-1 в порівнянні з іншими самицями, що також передавали R геном ($KW-H(1;8) = 4,0000$ $p = 0,0455$). Скоріше за все це пов'язано з тим, що ці самиці не проходили зимівлю і мали візуально помітні недорозвинені яєчники.

Різниця між активністю ЛДГ-1 в самиць з чотирьох різних ГПС не була виявлена ($p = 0,1116$ та $p = 0,7063$ для R і L геномів, відповідно).

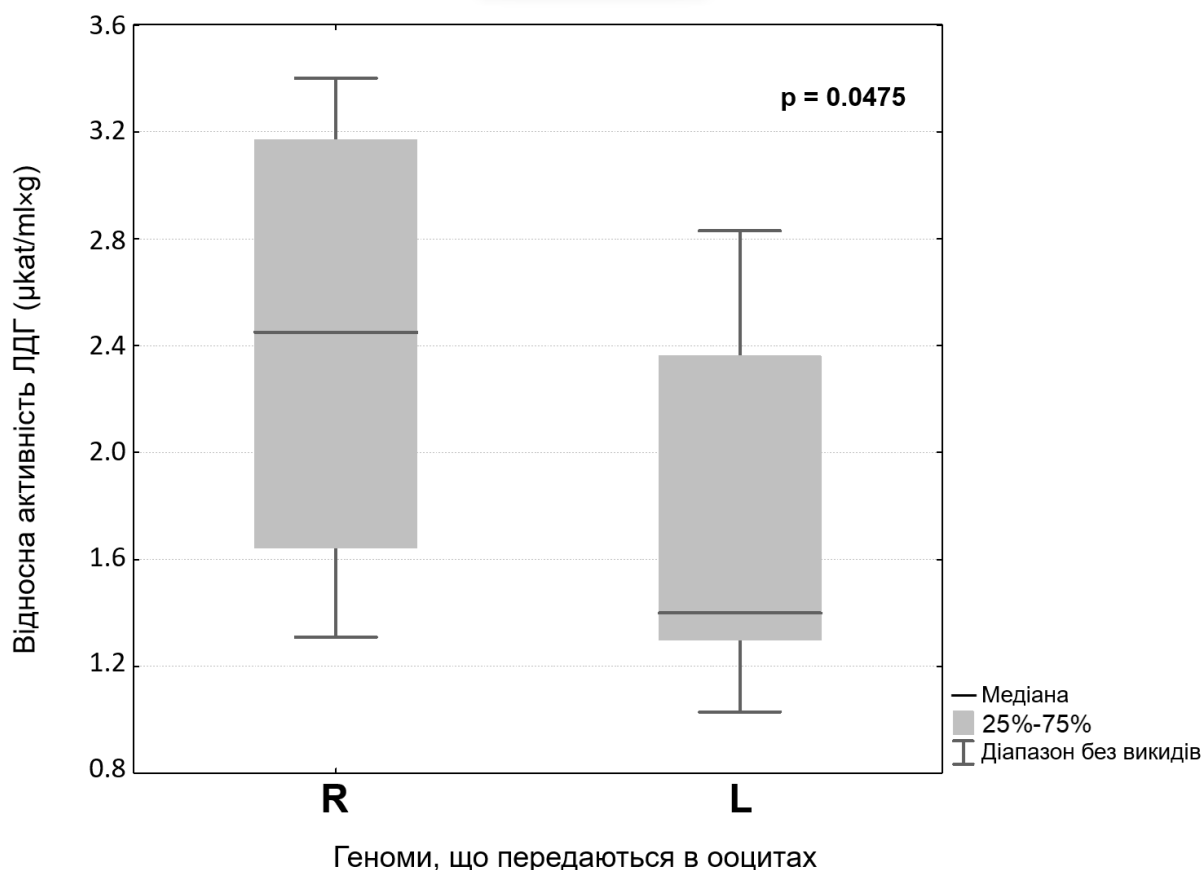


Рис 4.5. Активність ЛДГ-1 в ооцитах самиць, що передають різні геноми.

Різниця в активності R та L алозимів ЛДГ-1 може пояснюватися різницею в способі життя жаб з генотипами RR та LL. *P. ridibundus* мають більшу спорідненість з водним середовищем, через що вони можуть сильніше страждати від гіпоксії в порівнянні з *P. lessonae*, та потребують більш активного метаболізму. *P. ridibundus* зазвичай зимує на дні водойм і часто страждає від обморожень, в той час як для *P. lessonae* більш характерна зимівля на суші в порожнинах під корінням дерев (Berger & Berger, 1992; Plötner, 2005). Умови, в яких проживали досліджувані самиці, не відрізнялися суттєво між різними локалітетами. Більш того, всі особини провели деякий час в однакових лабораторних умовах та отримували однакове харчування.

РОЗДІЛ 5. ВИКОРИСТАННЯ ЗАПРОПОНОВАНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ВІДТВОРЕННЯ ГІБРИДІВ В ПРИРОДНИХ ГПС

5.1. Відтворення гібридів в ГПС Іськова ставу

5.1.1. Визначення складу ГПС в Іському ставі

За період з 2015 по 2021 рр. було відловлено та проаналізовано 653 особини зелених жаб з Іськова ставу, з них 596 дорослих особин, 31 ювеніл та 26 пуголовків (Drohvalenko et al., 2023; Drohvalenko, Fedorova & Pustovalova, 2019; Biliaiev et al., 2018). Визначення видової приналежності та плоідності проводилося за комплексом морфологічних, молекулярних та цитогенетичних методів.

Ювенільні особини первинно були відловлені на стадії пуголовків, проведені через метаморфоз в лабораторних умовах і дорощені до стану, коли їх таксономічну приналежність можна було впевнено визначити за комплексом морфологічних ознак (Макарян et al., 2016). У 2023 році їх таксономічна приналежність була підтверджена за допомогою методу FISH (Пустовалова Е. – особисте повідомлення).

Дисертантка особисто приймала участь у відлові жаб з Іськова ставу та отриманні матеріалу з 2018 по 2021 рік. Дані моніторингу з 2015 по 2017 надано для аналізу Шабановим Д. А. та Лабораторією популяційної екології амфібій.

Фінальний склад всіх досліджених особин з Іськова ставу представлено на Рис. 5.1.

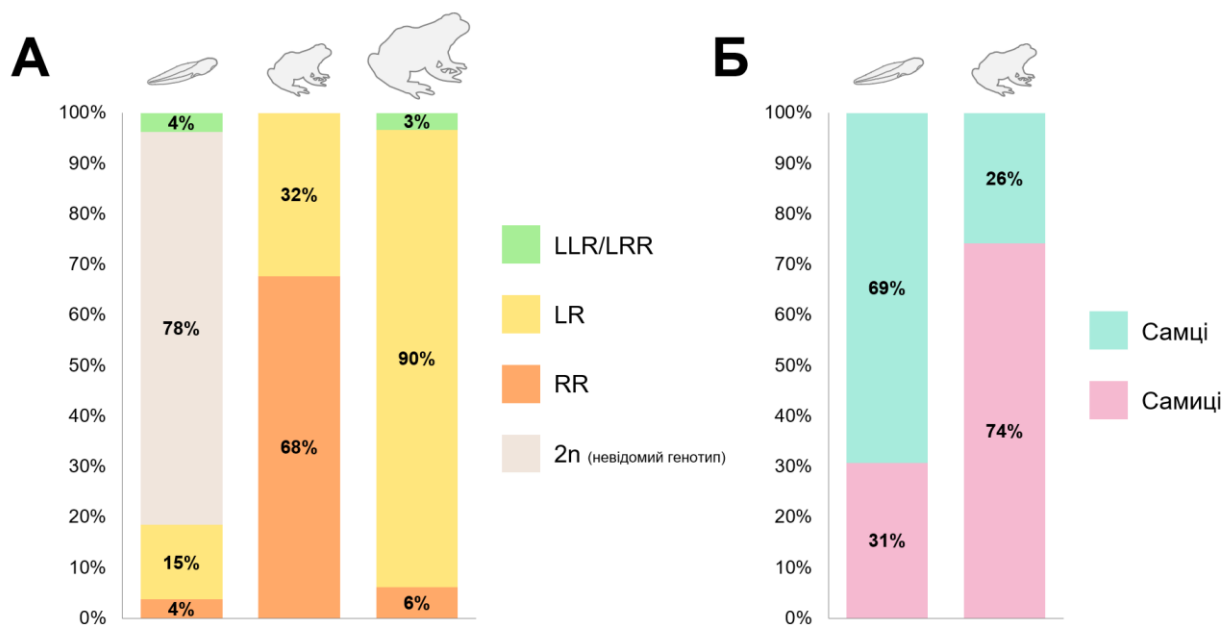


Рис. 5.1. Сумарна характеристика всіх досліджених особин Іського ставу за 2015-2021 роки. А – склад ГПС за генотипами та/або плоїдністю пуголовків, ювенілів та дорослих жаб (зліва направо, відповідно); Б – порівняння долі самців та самиць серед пуголовків та ювенілів.

Доля триплоїдів не відрізнялась між трьома віковими категоріями ($p = 0.9924$), в той час як доля *P. ridibundus* була значно більшою серед ювенілів, ніж серед дорослих особин ($p < 0.0001$). Різниця у співвідношенні статей серед пуголовків та ювенілів також виявилась статистично значущою ($\chi^2 = 10,7483$; $p = 0.0010$).

5.1.2. Визначення клональних ліній за допомогою аналізу мультилокусних генотипів (МЛГ)

В деяких ГПС батьківські види можуть бути повністю відсутні, а диплоїдні гібриди успішно співіснують і схрещуються з триплоїдними гібридами (Chmielewska et al., 2022; Christiansen, 2009). Стабільність таких ГПС залежить від здатності триплоїдів продукувати рекомбінантні гамети (за

рахунок рекомбінації тих геномів, що присутні у двох копіях, наприклад, L геном в триплоїдах LLR), а також від здатності диплоїдних гібридів продукувати диплоїдні гамети для підтримання пулу триплоїдів (Chmielewska et al., 2022; Christiansen, 2005, 2009; Christiansen et al., 2010). Інший гіпотетичний механізм підтримання складу чисто гібридної ГПС пов'язаний зі співіснуванням амфігаметних гібридів, які можуть продукувати одночасно різні типи гамет. Припускалося, що подібна система характерна для Іськова ставу, ГПС якого вперше була описана як чисто гібридна (Лада, 1998). Диплоїдні самці *P. esculentus* в Іському ставі є амфіспермічними (Pustovalova et al., 2022), в той час як самиці можуть продукувати гамети з R геномом (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2015). Базуючись на складі ГПС Іськова ставу та даних про те, які гамети характерні для гібридів, ми пропускаємо, що диплоїдні *P. esculentus* тут грають основну роль в розмноженні та підтриманні складу системи. Для перевірки цієї гіпотези ми проаналізували мультилокусні генотипи (МЛГ) вибірки гібридів з даного ставу (Drohvalenko et al., 2023).

Для 55 особин зелених жаб (50 дорослих і 5 пуголовків), зібраних у 2015 та 2020 роках, таксономічну приналежність було визначено за допомогою аналізу мікросателітних послідовностей за 16 локусами, які ампліфікуються в *P. esculentus*. Серед 16 обраних локусів 7 були специфічними виключно для R геному (Re2Caga3, Rrid082A, Res17, Rrid171A, Rrid064A, Rrid135A, Res22), 6 для L геному (RlCA18, RlCA2a34, Re1Caga10, RlCA5, CA1a27, Ga1a23), і ще 2 ампліфікувалися як в R, так і в L геномі (GA1A19 і RlCA1b5). Ще один локус (RlCA1b20) також був біспецифічним, однак всі ампліфіковані алелі зустрічалися як в R, так і в L геномі, тому цей локус не використовувався в подальшому аналізі. Алельний склад для кожної особини показано в Додатку 6.

Загалом було ідентифіковано 14 L-специфічних алелів з 1-4 алелями в кожному локусі, а також 49 R-специфічних алелів з 2-15 алелями в кожному локусі. При порівнянні інтенсивності сигналів кожного алеля ми не

зареєстрували дозового ефекту, який дозволив би відрізнити диплоїдів та триплоїдів у випадку, коли особина є гомозиготною за всіма проаналізованими локусами.

Серед 55 проаналізованих зелених жаб з Іськова ставу, для двох особин (одна доросла і один пуголовок) була підтверджена приналежність до батьківського виду *P. ridibundus*, в той час як всі інші виявились *P. esculentus*. Таким чином, мікросателітний аналіз підтвердив попередню таксономічну ідентифікацію за морфологією (для дорослих особин).

Для підтвердження генотипів визначених аналізом мікросателітних послідовностей ми також аналізували послідовності другого екзону ядерного гену *uqcrfs1*. Генотипи визначені за допомогою мікросателітного аналізу також відповідали генотипам визначеним за аналізом SNP гену *uqcrfs1*.

Серед гібридів за допомогою аналізу мікросателітних послідовностей та SNP в гені *uqcrfs1* було виявлено 6 триплоїдів. Всі триплоїди мали два R-алелі у R-специфічних локусах (Re2Caga3, Res17, Rrid064A, Rrid135A, Додаток 6).

Фінальна композиція вибірки дорослих 2020 року з Іськова ставу представлена в Таблиці 5.1 і Додатку 6. Більшість особин були диплоїдними *P. esculentus* з генотипом LR, 6 триплоїдних гібридів мали генотип LRR, і тільки одна особина виявилась батьківським видом *P. ridibundus*.

Таблиця 5.1

Склад вибірки Іськова ставу за 2020 рік

	Самці	Самиці	Разом
RR	1	1	2
LR	46	2	48
LRR	1	4	5

Для визначення клональних ліній в досліджуваній ГПС ми використовували аналіз мультилокусних генотипів (МЛГ). Мультилокусним генотипом називається набір ідентичних алелів в мікросателітних локусах. Невелика кількість комбінацій та висока їх частота може бути ознакою наявності клонального відтворення. З іншого боку, статеве відтворення з постійною рекомбінацією створює унікальні МЛГ в популяції. Іноді однакові МЛГ можуть бути знайдені в декількох непов'язаних особин зі статевим розмноженням, якщо дискримінаційний потенціал використаних маркерів є низьким. Через це ми вираховували значення «ймовірності ідентичності» (Probability of Identity, PI), статистики, що вираховує ймовірність того, що дві випадкові особини з популяції будуть мати однакові МЛГ з конкретним набором маркерів (Pruvost et al., 2015; Waits et al., 2001).

Оскільки ГПС Іськова ставу особини *P. ridibundus* є рідкісними, ми використовували дані *P. ridibundus* з ГПС Кременної (Донецька область) та Брусівки (Луганська область), для яких використовувалися ті ж самі мікросателітні локуси. Значення PI дорівнювало 1.3×10^{-7} в Кременній та Брусівці, вказуючи на те, що ймовірність мати ідентичні МЛГ для двох випадкових особин є дуже низькою з використанням нами набором локусів. Таким чином, ми підтвердили, що обраний нами набір мікросателітних локусів є ефективним для визначення клональних ліній геномів.

Серед 53 проаналізованих *P. esculentus* з Іськова ставу (49 дорослих та 4 пуголки) ми ідентифікували 9 L-специфічних МЛГ. П'ять з них були спільними для 45 особин (кожен характерний для 4-21 особини (Таблиця 5.2, Додаток 7)), в той час як інші 4 були унікальними. Розраховане алельне різноманіття для L геномів складало 1,75.

Кількість особин *P. esculentus*, що мають кожен варіант L-специфічного МЛГ.

МЛГ L-геномів	LR		LRR		Алелі поліморфних локусів L-геномів			
	самці	самиці	самці	самиці	RICA18	Re1Caga10	RICA5	Ga1a23
A	3	-	-	1	184	96	263	112
B	3	-	-	1	186	83	263	112
C	15	-	-	-	186	96	260	112
D	18	1	-	2	186	96	263	112
E	5	-	-	-	190	96	263	112
F	1	-	-	-	184	96	263	112
G	1	-	-	-	186	83	260	112
H	1	-	-	-	186	96	263	107
I	-	-	1	-	188	96	263	112

Оскільки 3 з 5 особин з генотипом LRR, а також два *P. ridibundus*, мали більш ніж один гетерозиготний R-специфічний локус, ми не могли впевнено розрізнити два R геноми. Таким чином, для R геномів цих особин ми сконструювали всі можливі комбінації алелів та проаналізували їх в загальному пулі R геномів як окремі одиниці. В результаті ми отримали чотири сконструйовані МЛГ для всіх особин, що мали два гетерозиготних локуси, та вісім сконструйованих МЛГ у випадку наявності трьох гетерозиготних локуси (Додаток 7).

Серед 53 проаналізованих *P. esculentus* і 2 *P. ridibundus* (та 76 R геномів, відповідно), ми ідентифікували 74 R-специфічних МЛГ (Додаток 7). Одним з двох особин, що мали однакові МЛГ, був самець *P. ridibundus* (RR), чий потенційні МЛГ були сконструйовані вручну і можуть не існувати в природі. Дві інші особини з цих трьох були диплоїдними *P. esculentus* (одна доросла особина і один пуголовок). Всі інші 73 МЛГ були унікальними. Алельне різноманіття для R геномів складало 5,56.

При аналізі тільки гібридів з одним геномом R (диплоїдні особини LR) ми знайшли 48 МЛГ, один з яких був спільним для двох особин (одного дорослого і один пуголовка), всі інші були унікальними.

Загалом, клональність, вирахована завдяки аналізу МЛГ на основі 13 видоспецифічних і 2 біспецифічних локусів, виявилось дуже різним в L та R геномах. В той час як для L геномів була характерна кластеризація у 9 МЛГ, всі (окрім трьох) R геноми мали унікальні комбінації алелів у проаналізованих мікросателітних послідовностях.

Алельне різноманіття L геномів було у 3,17 разів меншим за алельне різноманіття R геномів. L-специфічні алелі в конкретних локусах відрізнялися на декілька мікросателітних мотивів: чотири варіанти алелів в локусі R1CA18 та по два алелі в інших локусах (Таблиця 5.2).

Таке низьке алельне різноманіття L геномів серед досліджуваних гібридів очевидно пов'язано з відсутністю *P. lessonae* в басейні Сіверського (Biriuk et al., 2016; Shabanov et al., 2020; Шабанов, 2014; Шабанов et al., 2009). Різноманіття, що спостерігається в L-геномах гібридів, має відображати різноманіття серед особин *P. lessonae*, які брали участь у первинній гібридизації. Сучасне різноманіття L-геномів не може бути збагачене новими алелями зі статевого генофонду *P. lessonae* так, як можуть збагачуватися R-геноми симпатричного *P. ridibundus*. Єдиний спосіб збільшення генетичної різноманітності в L-геномах гібридогенетичних ліній — це мутації. Тут також варто зазначити, що незважаючи на відсутність *P. lessonae* в басейні Сіверського Дінця, гени цього батьківського виду присутні там завдяки гібридам. Гібридогенетичні лінії *P. esculentus* тут служать «транспортерами» для перенесення генів «*lessonae*» до регіонів, де сам батьківський вид не живе. Даний феномен також спостерігається зелених жаб з інших частин Європи, наприклад, у південній Франції та прилеглих частинах Іспанії, де гібридогенетичний гібрид *P. grafi* (що виник в результаті гібридизації між *P. ridibundus* і *P. perezi*) переносить гени *P. ridibundus* у райони, де

P. ridibundus не поширений (Arano et al., 1994; Pagano, Lodé, et al., 2001; Pagano, Crochet, et al., 2001).

Ми не маємо даних про рекомбінацію L-геномів в ГПС Іськова. Однак, ми припускаємо, що існує потенційний механізм підтримки різноманітності L-геномів на заданому рівні: за відсутності *P. lessonae* ця роль, можливо, покладається на триплоїдних гібридів з геномом LLR. Здатність до рекомбінації подвоєних геномів була показана для триплоїдів з деяких популяційних систем Західної Європи (Christiansen, 2009; Christiansen & Reyer, 2009; Pruvost et al., 2015). Ми не зафіксували гібридів LLR в досліджуваній вибірці з 53 особин, однак присутність цієї форми в ГПС Іськова ставу була показана раніше (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2015; Шабанов, 2014). Дослідження R-E-ГПС з басейну ріки Одра показали, що за відсутності триплоїдів різноманіття L геномів може звестися до лише однієї клональної лінії (Doležalková-Kaštánková et al., 2018). Проте частка LLR-гібридів в ГПС Іськова ставу є досить низькою. Крім того, поява особин з геномом LLR має залежати від диплоїдних LR гамет і гаплоїдних L-гамет, частка яких тут також не є високою, а LL гамети в даній системі взагалі не описані (Таблиця 5.3) (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2015; Pustovalova et al., 2022). Цікавим є те, що для однієї триплоїдної самиці LLR з Іськова ставу було показано продукування диплоїдних гамет LR (Таблиця 5.3) (Dedukh et al., 2015). Але оскільки LLR триплоїдів в даній системі мало, ми припускаємо, що значну роль у продукуванні LR-гамет відіграють диплоїдні гібридні самиці LR. Той факт, що диплоїдні гібридні самиці можуть продукувати диплоїдні гамети, був показаний для багатьох інших систем (Biriuk et al., 2016; Christiansen, 2009; Dedukh et al., 2015).

Типи гамет, що продукуються особинами *P. esculentus* з Іського ставу, відомі з попередніх досліджень даного локалітету. Дужки – клональні гамети

Форма	Гамети	К-ть особин	Посилання
♂ LR	(L) (R)	16	Biriuk et al. 2016 Pustovalova et al. 2022
♀ LR	(R)	5	Biriuk et al. 2016 Dedukh et al. 2015
♂ LRR	R	1	Biriuk et al. 2016
♀ LRR	R	1	Biriuk et al. 2016
♀ LLR	(L)(R)	1	Dedukh et al. 2015

Оскільки в ГПС Іського ставу присутня невелика порція батьківського виду *P. ridibundus*, R геноми мають більше можливостей для підтримання свого різноманіття. Схожа ситуація спостерігалась в деяких популяційних системах в західній Словаччині, де *P. esculentus* продукують виключно гамети з геномом R та залежать від дуже невеликої кількості *P. lessonae* в популяційній системі (Mikulíček et al., 2015). Однак, ГПС Іського ставу також містить невелику частку триплоїдів з геномом LRR, що потенційно можуть продукувати рекомбінантні гамети, як це було показано для багатьох інших систем з триплоїдами (Christiansen, 2009; Christiansen et al., 2005; Christiansen & Reyer, 2009; Pruvost et al., 2015). Високе різноманіття R геномів може бути непрямим доказом наявності рекомбінації в даній ГПС.

Однак, відсутність помітної кількості клональних ліній серед R геномів також викликає питання. Диплоїдні гібриди є найчисельнішою групою в Іському ставі, вони є фертильними, а самці здатні продукувати як L, так і R гамети (Таблиця 5.3). Схрещування між диплоїдними гібридами в Іському ставі мало б призводити до утворення особин з клональними геномами (L)(R)

та (R)(R) (Рис. 5.2). Якби всі такі особини в потомстві систематично виживали і доживали до статевої зрілості, ми врешті решт бачили б вищий рівень клональності серед R геномів гібридів, та вищу частку *P. ridibundus*. Однак, ми не бачимо ні того, ні іншого. Можливо, єдиний пуголовок і єдина доросла особина, що мали однаковий МЛГ, є результатом подібного схрещування.

Серед проаналізованих метаморфів з Іськова ставу (Макарян et al., 2016) була знайдена велика частка самиць *P. ridibundus*. Такі самиці мали утворитися від схрещувань між диплоїдними *P. esculentus* і в подальшому помирали через наявність двох клональних геномів.

		♀		♂			
		RR	LR	LRR	LLR		
♂	♀	R	(R)	(L)(R)?	R*	(L)(R)	L?
		RR	R	RR	(R)R	(L)(R)R	RR
LR	(L)	(L)R	(L)(R)	(L)(L)(R)	(L)R	(L)(L)(R)	L(L)
	(R)	(R)R	(R)(R)	(L)(R)(R)	(R)R	(L)(R)(R)	L(R)
LRR	R*	RR	(R)R	(L)(R)R	RR	(L)(R)R	LR
LLR	L?	LR	L(R)	(L)(L)(R)	LR	L(L)(R)	LL

Рис. 5.2. Схема потенційних схрещувань в ГПС Іськова ставу на основі даних про гамети, які продукуються особинами з даної ГПС (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2015; Pustovalova et al., 2022). Дужки – клональні геноми. Зелений – форми, що присутні серед дорослих особин. Жовтий – форми, що присутні у великій кількості серед ювенілів, але у малій кількості серед дорослих. Червоний – форми, які не було знайдено. * – невідомо, дані гамети мають клональні чи рекомбінантні геноми. ? – типи гамет, наявність яких припускається на основі даних з географічно близьких ГПС в басейні р. Сіверський Донець (див. Таблицю 6.3). Розмір та кількість клітинок на схемі не відображає реальну кількість гамет чи форм, які присутні в досліджуваній

ГПС, лише дає уявлення про те, які форми зелених жаб мають утворюватися виходячи з даних про типи гамет присутні у ГПС.

Також не можна виключати екологічні умови Іськава ставу, які могли мати вплив на формування складу ГПС. Ми можемо припустити, що особини LL та RR, які виникають від схрещувань гібридів, можуть потенційно доживати до першої гібернації (Jakob & Arioli, 2007). Також відомо, що *P. ridibundus* переважно зимують під водою (Berger & Berger, 1992) і є найменш толерантними до низької концентрації кисню у воді серед українських видів роду *Pelophylax* (Plötner, 2005).

Іськів став є неглибоким і за час моніторингу нами пройшов через масивне осушення та декілька періодів активного розмноження водоростей. Це в сумі могло призвести до зниження рівню кисню у водоймі та заважати успішній зимівлі жаб під водою, що в свою чергу призвело до підвищення смертності *P. ridibundus* та зменшення їх частки в популяційній системі. *Pelophylax esculentus*, з іншого боку, є більш адаптованими до існування в ізольованих водоймах і мають тенденцію до міграцій на більші відстані (Plötner, 2005). Також, пуголовки з генотипом LR краще виживають в складних умовах (Semlitsch & Reyer, 1992). В сумі це призводить до кращого виживання особин *P. esculentus* та потенційно полегшує для них повторне заселення водойми з сусідніх територій у випадку осушення ставу в деякі періоди його існування.

5.2. Відтворення триплоїдних гібридів в R-Erf-ГПС

У 2018 році було встановлено, що ГПС заплавного озера в околицях с. Брусівка (Донецька область) складається з представників *P. ridibundus* обох статей та виключно триплоїдних самиць *P. esculentus* з генотипом LLR (Дрогваленко et al., 2017). Самці *P. esculentus* будь-якої плоїдності або диплоїдні самиці в цій ГПС відсутні. Таким чином, було описано R-Erf-ГПС.

У зв'язку з незвичним складом даного типу ГПС ми виділяємо три ключові питання, пояснення кожного з яких потребує окремих гіпотез.

Питання №1: Відсутність диплоїдних гібридів.

- Гіпотеза 1а: присутність LL-гамет та відсутність L-гамет (самиці LLR в R-Erf-ГПС продукують виключно LL-гамети).
- Гіпотеза 1б: подвоєння L-геному в усіх яйцеклітинах (самиці LLR в R-Erf-ГПС продукують виключно або частково гаплоїдні L-гамети, геном яких подвоюється після запліднення, що призводить до формування триплоїдних зигот.
- Гіпотеза 1в: елімінація диплоїдних гібридів LR до того, як вони досягнуть статевої зрілості. Різні варіації даної гіпотези мають враховувати смерть гібридних самців на різних стадіях розвитку.

Питання №2: Відсутність гібридних самців.

Стать потомства в даній ГПС визначається статевими хромосомами батька *P. ridibundus*. В типовому випадку, ми мали би очікувати, що приблизно половина потомства від схрещувань самиць LLR та самців RR будуть самцями. Якщо не враховувати співіснування з самицями LLR, відтворення *P. ridibundus* в R-Erf-ГПС мало би проходити нормальним чином. Однак, ми спостерігаємо повну відсутність гібридних самців.

- Гіпотеза 2а: з усіх типів зигот розвиваються самиці, незалежно від наявності геному R^Y.

- Гіпотеза 2б: елімінація самців до того, як вони досягнуть статевої зрілості. Різні варіації даної гіпотези мають враховувати смерть гібридних самців на різних стадіях розвитку.

Питання №3: Присутність триплоїдних гібридних самиць LLR.

В типовому випадку наявність триплоїдних гібридів в ГПС є наслідком продукування диплоїдних гамет диплоїдними гібридами (Dedukh et al., 2017). Однак в Брусівській ГПС самиці LLR можуть утворюватися тільки від схрещувань між самицями LLR та самцями RR, оскільки будь-яке інше джерело L геномів відсутнє. Гіпотетичне припущення про продукування диплоїдних гамет самцями *P. ridibundus* могло би пояснити утворення LRR гібридів (дані форми відсутні у досліджуваній ГПС), але не. Таким чином, даний парадокс може бути пояснений лише двома гіпотезами:

- Гіпотеза 3а: продукування диплоїдних LL-гамет самицями LLR.
- Гіпотеза 3б: подвоєння L-геному в зрілих гаметах або зиготах. Подвоєння може відбуватися саме по собі, або як реакція на запліднення яйцеклітин сперматозоїдами.

Для вирішення трьох вище поставлених питань та перевірки запропонованих гіпотез ми провели штучні схрещування двох пар зелених жаб з даної ГПС (Таблиця 5.4) та проаналізували склад потомства (Таблиця 5.6) (Drohvalenko et al., 2023; Fedorova & Pustovalova, 2019).

Таблиця 5.4

Характеристики зелених жаб з Брусівської, що були використані для штучних схрещувань

	Код	Стать	Таксономічна приналежність	Довжина тіла, мм
Пара №1	17В-3	♀	<i>P. esculentus</i>	68.3
	17В-10	♂	<i>P. ridibundus</i>	66.4
Пара №2	17В-4	♀	<i>P. esculentus</i>	63.4
	17В-8	♂	<i>P. ridibundus</i>	64.3

Від кожної пари було проаналізовано по 10 пуголовків, що знаходились між 28 (довжина зачатку кінцівки більша за діаметр зачатку кінцівки) та 37 (розвинені п'ять пальців кінцівок) стадіями розвитку (Gosner, 1960), оскільки на цих стадіях вже можна було ідентифікувати стать пуголовків за морфологією гонад. Серед 20 проаналізованих пуголовків 8 були самцями і 11 були самицями. Для одного пуголовка визначити стать виявилось неможливим через поганий стан тканин зразка. Всі проаналізовані пуголовки мали нормально розвинені гонади і не мали однак аномалій розвитку.

Таблиця 5.5

**Характеристика пуголовків отриманих від штучних схрещувань
двох пар з Брусівської ГПС**

Батьки	Код пуголовка	Плоідність	Генотип	Стать	Стадія	Довжина тіла (без хвоста)	Довжина тіла (з хвостом)
Пара 1	450	2n	–	m	31	13	21
	451	3n	LLR	m	31	8,9	24,2
	452	2n	LR	m	30	8,2	23,3
	453	Mosaic	L?R	m	28	9	21,2
	454	3n	LLR	f	28	8,1	19,9
	455	3n	LLR	m	31	11,1	24,1
	456	2n	LR	f	31	8,1	19
	457	3n	LLR	–	28	8,4	20,3
	458	3n	LLR	m	30	9,4	23,8
	459	2n	LR	f	33	12,1	29,5
Пара 2	460	3n	LLR	f	32	12,7	29,6
	461	3n	LLR	m	32	13	28,2
	462	2n	LR	f	30	12,3	25,3
	463	2n	LR	f	37	17	38,6
	464	2n	LR	f	32	12,4	29,6
	465	2n	LR	m	32	29,5	26
	466	3n	LLR	f	33	12,3	30,5
	467	3n	LLR	f	31	17	27,2
	468	2n	LR	f	30	14,3	25,8
	469	2n	LR	f	31	13	22,1

Каріологічний аналіз показав, що 11 пуголовків були диплоїдами і 8 були триплоїдами. Однак, для одного пуголовка ми знайшли одночасно велику кількість як диплоїдних, так і триплоїдних хромосомних пластинок (Рис. 5.3). Таким чином, ми не можемо визначити його плоїдність і робимо припущення, що він є мозаїком, принаймні в тканинах кишківника, які використовувались для каріоаналізу.

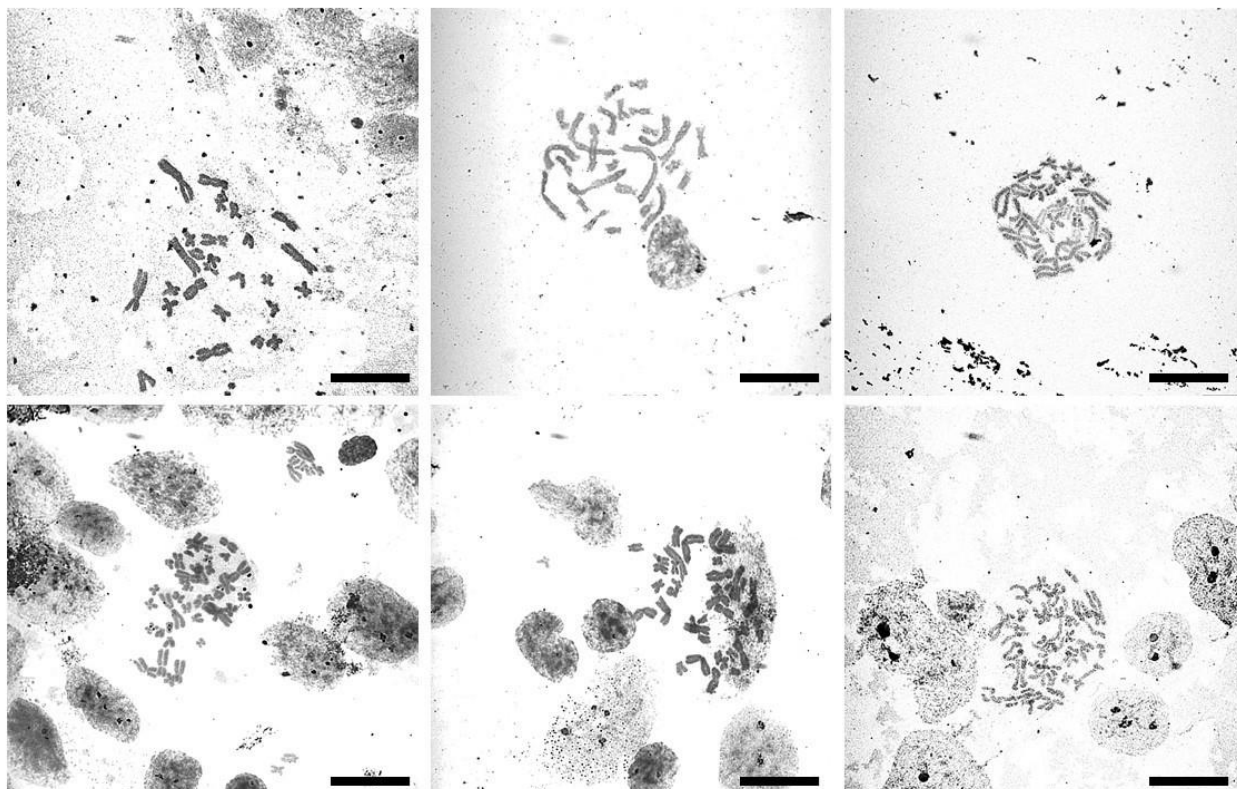


Рис. 5.3. Диплоїдні (вгорі, $n=26$) і триплоїдні (внизу, $n=39$) хромосомні пластинки з тканин кишківника пуголовка, ідентифікованого як «мозаїк»; фарбування нітратом срібла, шкала – 20 мкм (Фото – Пустовалова Е. С.)

Мікросателітний аналіз показав, що всі пуголовки з двох схрещувань виявилися гібридами (див. результати мікросателітного аналізу в Додатку 8). Однак, цей метод виявився неефективним для визначення плоїдності в даній ГПС, оскільки в обох потомствах пуголовки були гомозиготними як за всіма 5 L-специфічними, так і за 5 R-специфічними локусами незалежно від їх плоїдності. В кожному потомстві ми спостерігали розщеплення за R-

специфічними локусами, однак не спостерігали розщеплення за L-специфічними локусами (Додаток 8). Таким чином, у випадку гомозиготності в обох геномах та розщепленню за R-специфічними локусами ми можемо бути впевненими, що пуголовки мали геномну композицію LLR. В протилежному випадку хоча б деякі пуголовки мали б бути гетерозиготними за R-специфічними локусами, оскільки вони отримали R геноми від різних батьків. Дані результати також співвідносяться з результатами аналізу геномів в ооцитах LLR самиць з Брусівської ГПС, який показав, що дані самиці передають геном L в гаметах (див. розділ «Різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС»).

Результати проведених штучних схрещувань та аналізу потомства дозволяє частково відповісти на поставлені питання та зробити висновки щодо запропонованих гіпотез:

1) Оскільки ми знайшли диплоїдних гібридів серед пуголовків, ми можемо бути впевнені, що самиці LLR продукують L гамети хоча б частково. Відсутність дорослих диплоїдів підтверджує, що вони гинуть на якомусь етапі онтогенезу. Таким чином, ми відкидаємо гіпотези 1а та 1б, і підтверджуємо гіпотезу 1в (елімінація диплоїдних гібридів LR до того, як вони досягнуть статевої зрілості).

2) Наявність як диплоїдних так і триплоїдних гібридних самців серед потомства дозволяє відкинути гіпотезу 2а та підтвердити гіпотезу 2б (елімінація самців до того, як вони досягнуть статевої зрілості).

3) Отриманих даних про склад потомства недостатньо для відповіді на питання №3 (питання про те, коли саме відбувається дуплікація L геному) та підтвердження чи спростування запропонованих гіпотез, тому подальші дослідження є необхідними.

Також результати проведених схрещувань підтверджують отримані раніше дані про те, що самиці LLR передають в своїх гаметах геном L (див. Розділ «Різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС»).

Відкритим також залишається питання про те, чому і коли саме гинуть три з чотирьох форм гібридів, які утворюються при схрещуваннях гібридних триплоїдних самиць з самцями *P. ridibundus*.

5.3. Смертність пуголовків в R-E-Ep ГПС Нижнього Добрицького ставу

5.3.1. Визначення складу дорослих особин і пуголовків ГПС Нижнього Добрицького ставу

Загалом за 2015-20223 роки було зібрано 760 особин з Нижнього Добрицького ставу (635 дорослих, 29 метаморфів та 96 пуголовків). Загальна характеристика всіх досліджуваних особин з даної ГПС представлена в Таблиці 5.6 (Fedorova, 2019; Pustovalova et al., 2019; Fedorova, Drohvalenko & Pustovalova 2018; Biliaiev et al., 2018).

Дисертантка особисто приймала участь у відлові жаб з Нижнього Добрицького ставу та отриманні матеріалу з 2017 по 2021 рік. Дані з 2015 по 2016 надано для аналізу Шабановим Д. А. та Лабораторією популяційної екології амфібій.

Таблиця 5.6

Загальний склад досліджених особин ГПС Нижнього Добрицького ставу

Таксономічна приналежність	Дорослі	Метаморфи	Пуголовки
<i>P. ridibundus</i>	80	29	64
<i>P. esculentus</i> , 2n	473		24
<i>P. esculentus</i> , 3n	82	0	8

Всі дорослі особини виявилися *P. ridibundus* (80 особини) та *P. esculentus* (473 диплоїдів та 82 триплоїд), на основі чого дана ГПС визначена як R-E-Ep-ГПС. Ми не акцентували увагу на статі дорослих особин. Оскільки відлов проводився зазвичай у кінці червня або на початку липня, коли нерест добігав кінця і багато самиць вже відклали ікру та покинули водойми, наші дані про

кількість самців та самиць не відображатимуть реальне співвідношення статей у ГПС. Плоїдність дорослих особин ми визначали за допомогою морфометрії еритроцитів та частково підтверджували каріоаналізом та / або проточною ДНК цитометрією.

Серед метаморфів всі особини виявились диплоїдами (13 самців та 16 самиць). Плоїдність всіх метаморфів була надійно визначена за допомогою каріоаналізу. Однак, ми не визначали таксономічну приналежність метаморфів, оскільки на момент дослідження були доступні тільки морфологічні або морфометричні методи, які не є надійними для молодих особин зелених жаб.

Всі відловлені 96 пуголовків знаходилися на стадії розвитку від 24 (operulum development) до 41 (cloacal tail piece lost) згідно (Gosner, 1960). Для всіх пуголовків ми визначили генотипи за допомогою мікросателітного аналізу за 17 локусами, серед яких 5 були *L*-специфічними (RICA18, RICA2a34, RICA5, CA1a27, Ga1a23), 7 були *R*-специфічними (Re2Caga3, Rrid082A, Res17, Rrid064A, Rrid135A, Res22) і ще 5 були біспецифічними (GA1A19, RICA1b5, Re1Caga10, Rrid059A, Rrid171A) (детально в Додатках 5 та 9). Ми не спостерігали дозового ефекту алелів у триплоїдних особин. Серед всіх пуголовків 64 мали генотип RR, 24 – LR, 7 – LRR, і лише один пуголовок мав генотип LLR. Жодного пуголовка з генотипом LL не було виявлено. Для 20 пуголовків ми також визначили стать за морфологією гонад після розтину (14 пуголовків були самцями і 6 були самицями).

Протягом 2015-2023 частка дорослих *P. ridibundus* в Нижньому Добрицькому ставі варіювала від 6.3% до 20.9% і в середньому складала 13% за всі роки, в той час як серед пуголовків 67% мали генотип RR (Рис 5.4 А). Різниця в частках *P. ridibundus* серед пуголовків та дорослих жаб була значущою ($p < 0.0001$).

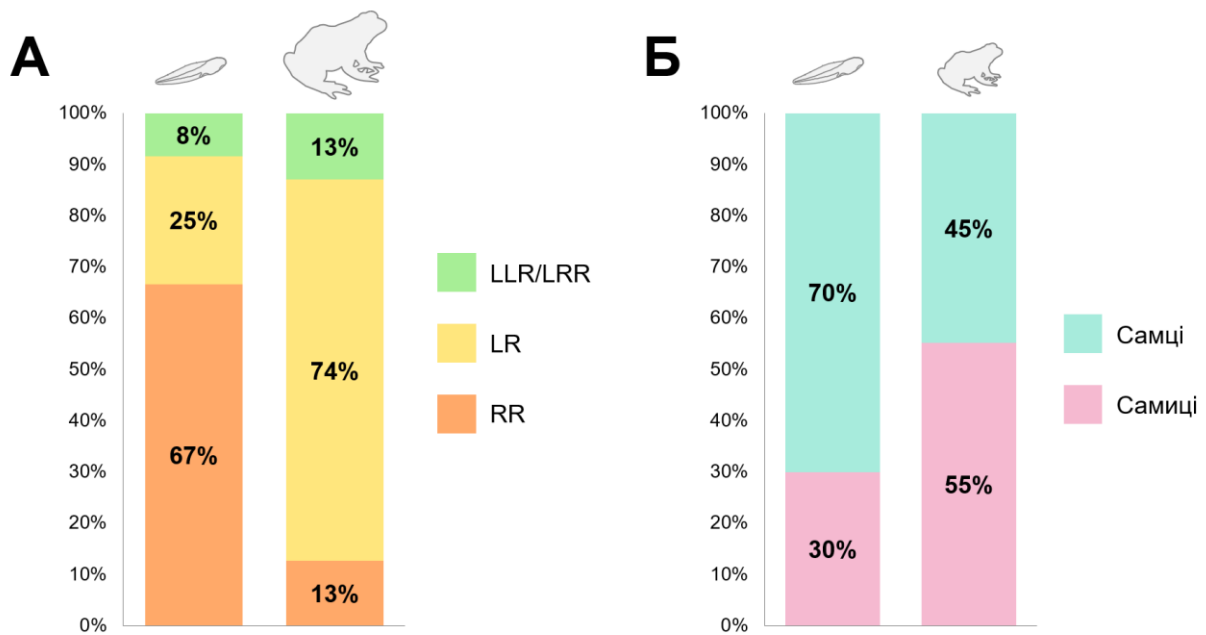


Рис. 5.4. Порівняння часток особин з різним генотипом серед пуголовків та дорослих жаб за період моніторингу з 2015 по 2023 роки (А) та порівняння часток особин різної статі серед пуголовків та метаморфів (Б).

Частка триплоїдів серед пуголовків та дорослих не відрізнялась (13.3% vs. 8.3%, $p=0.1955$). Однак, даний результат ми приймаємо з обережністю, оскільки не всі дорослі особини були досліджені молекулярними методами чи каріоаналізом, і якась частка триплоїдів могла бути помилково визначена як диплоїди (див. Розділ 3.4.1 «Ефективність вимірювання розмірів еритроцитів для визначення плідності гібридів»).

Ми не зафіксували різниці у частках самців та самиць серед пуголовків та метаморфів ($\chi^2 = 3.0317$, $p = 0.0816$. Рис 5.4 Б).

5.3.2. Клональні лінії пуголовків

Для ідентифікації клональних ліній L та R геномів пуголовків ми провели аналіз мультилокусних генотипів (МЛГ) на основі 16 мікросателітних локусів (Додаток 9) (Drohvalenko et al., 2023).

Оскільки єдиний пуголовок з генотипом LLR мав лише один гетерозиготний локус, ми могли відрізнити два L геноми цієї особини між собою і проаналізувати їх окремо. Всього ми знайшли 11 L-специфічних МЛГ серед 32 гібридних пуголовків (і 33 L геномів, відповідно). Один МЛГ був спільним для 19 особин, ще два для двох і трьох, відповідно, а всі інші були унікальними (Додаток 10). Розраховане алельне різноманіття для L геномів складало 3,0.

Різноманіття R геномів було проаналізовано для гібридних пуголовків, що мали лише один R генотип (24 LR та один LLR), а також для чотирьох пуголовків з генотипом LRR, що мали лише один гетерозиготний локус, завдяки чому ми могли розрізнити два різні R геноми. Для 29 проаналізованих пуголовків ми знайшли 29 унікальних МЛГ. Розраховане алельне різноманіття для R геномів складало 4,3.

Додатково тим же набором мікросателітних локусів було проаналізовано двох дорослих особин з Добрицького ставу (LR та LRR). Як L-специфічні, так і R-специфічні МЛГ цих особин були унікальними в порівнянні з МЛГ пуголовків.

Оцінити клональність R геномів у пуголовків з генотипом RR не було можливим, оскільки всі окрім одного мали більше ніж один гетерозиготний локус, що не дозволяло нам відрізнити окремі R геноми. Розраховане алельне різноманіття R геномів серед LR та RR пуголовків разом складало 5,9.

Таким чином, різноманіття L геномів є значно нижчим за різноманіття R геномів в ГПС Нижнього Добрицького ставу. Ми не знайшли жодної клональної лінії серед R геномів, в той час як серед L геномів були присутні як мінімум три потенційні клональні лінії (одна з ліній була присутня у більше ніж половини проаналізованих гібридів).

Порівнюючи геномні композиції пуголовків та дорослих жаб ГПС Нижнього Добрицького ставу, ми бачимо, що не дивлячись на переважання R гамет, що продукуються як самцями, так і самицями (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017), а також високу частку *P. ridibundus* серед пуголовків, ми

спостерігаємо відносно низьку частку *P. ridibundus* серед дорослих особин. Причиною даного феномену має бути вибіркоча смертність гібридолізних батьківських форм (виникають від схрещувань гібридів між собою) серед пуголовків (Günther & Plötner, 1988; Plötner, 2005). Даний феномен був описаний для *Pelophylax esculentus* complex раніше (Reyer et al., 2015; Vorburger, 2001). Попередні дослідження Іськова ставу показують, що гібридолізні *P. ridibundus* скоріше за все проходять метаморфоз, але не переживають першу зимівлю (Макарян et al., 2016).

Високий рівень смертності серед *P. ridibundus* спостерігався для популяційних систем північної та центральної Європи. Було показано, що ті особини, що виникли внаслідок гібридолізу, часто мають аномалії розвитку і в більшості випадків помирають до досягнення статевої зрілості (Berger, 1968, 1971; Plötner, 2005; Reyer et al., 2015)

Висувалося припущення, що така висока смертність серед гібридолітичного потомства викликана наявністю двох клоначьних геномів, що накопили велику кількість мутацій (Vorburger, 2001). Однак, наші дані показують дуже високу варіабельність R геномів серед проаналізованих пуголовків. Таким чином, якісь інші причини мали б приводити до смертності більшої частини пуголовків з генотипом RR.

Наприклад, ми висунули припущення про вплив екологічних умов на виживання певних форм жаб в ГПС Іськова ставу (див. Розділ 5.1 «Відтворення гібридів в ГПС Іськова ставу»). Однак, дане припущення не спрацьовує для Нижнього Добрицького ставу, який не переживав критичного осушення протягом досліджуваного періоду. Ймовірно, на виживання певних генотипів в даній системі впливають інші, поки невідомі нам фактори.

5.4. Оцінка ефективності методів аналізу ГПС, використаних в дисертаційному дослідженні

Для частини проаналізованих дорослих особин (50 жаб з ГПС Іськова ставу) окрім морфологічного визначення таксономічної приналежності було також проведено визначення генотипів за допомогою мікросателітного аналізу та аналізу SNP гену *uqcrfs1* (див. розділ 5.1 " Відтворення гібридів в ГПС Іськова ставу "). Для всіх особин визначення таксономічної приналежності за результатами морфологічного аналізу співпало з результатами молекулярного. Таким чином, морфологічне визначення таксономічної приналежності особин має високий ступінь надійності для дорослих жаб, однак може бути помилковим для ювенільних особин і взагалі неможливий для пуголовків (Drohvalenko, 2021; Günther, 1978).

Також морфологічні ознаки не дозволяють відрізнити гібридів різної плоїдності між собою. Метод вимірювання розмірів еритроцитів, який успішно використовується для визначення плоїдності різних хребетних тварин (Cal et al., 2005; Maxime & Labbé, 2010), не показує високої надійності для *P. esculentus* за нашими результатами. В досліджуваній вибірці лише близько половини триплоїдів мали довжину клітин, площу клітин чи площу ядер еритроцитів, що були помітно більшими за відповідні розміри клітин та ядер диплоїдних *P. ridibundus*, використаних в якості контрольної групи (див. розділ 3.4 "Розмір еритроцитів для оцінки плоїдності"). Даний метод може використовуватися для первинної детекції наявності триплоїдних гібридів в ГПС, однак він не дозволить визначити точні частки триплоїдів та диплоїдів. В той час як визначення плоїдності для тієї ж вибірки за допомогою мікросателітного аналізу та аналізу SNP, та/або проточної ДНК цитометрії та FISH співпадали на 100%.

Таким чином, для точного встановлення складу геміклональних популяційних систем морфологічний аналіз та цитометрію еритроцитів

необхідно супроводжувати хоча б одним з молекулярних або цитогенетичних методів, згаданих вище.

Визначення геномів, що передаються в ооцитах самиць можливе за аналізом алозимів ЛДГ-1 (див. розділ 4.2 "Різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС"). Однак цей метод не дозволяє визначити плідність ооцитів або частку ооцитів з різними геномами (якщо самиця є амфігаметною). Ефективним способом визначити ці дві характеристики гамет є лабораторні схрещування та аналіз отриманого потомства. При аналізі алозимів ЛДГ-1 триплоїдних самиць (ГПС заплавного ставу в околицях с. Брусівка) ми визначили, що вони передають геноми L, що співпало з результатами аналізу генотипів пуголовків отриманих від схрещування даних самиць з самцями *P. ridibundus*, а аналіз потомства показав, що ймовірно ці самиці продукують суміш гамет L та LL.

Оцінка ефективності кожного з використаних в дисертаційній роботі методів наведена в Таблиці 5.7.

Таблиця 5.7

Оцінка ефективності методів дослідження ГПС.

Метод	Параметр, який визначає/описує	Життєва стадія	Оцінка	Доступність, зручність
Морфологія	Таксономічна приналежність	Дорослі	Працює	+++ Швидкий, не потребує фінансових витрат
		Ювеніли	Працює частково <i>Надійний у випадку дорощування до статевої зрілості</i>	
		Пуголовки	Не працює	
Цитометрія еритроцитів	Плоїдність	Дорослі	Працює частково <i>Детекція наявності триплоїдів в ГПС, але не визначення точної частки</i>	+++ Швидкий, мінімальні фінансові витрати
		Ювеніли	Не працює	
		Пуголовки	Не працює	
Цитометрія сперматозоїдів	Плоїдність сперматозоїдів	Дорослі	Не працює	+++ Швидкий, мінімальні фінансові витрати
		Ювеніли	– (не використовується)	
		Пуголовки	– (не використовується)	
ДНК-цитометрія, Мікросателітний аналіз, SNP гену <i>uqcrfs1</i> , Каріоаналіз/FISH	Генотип (таксономічна приналежність + плоїдність)	Дорослі	Працює. <i>Точне визначення генотипу дорослих, ювенілів та пуголоків</i>	+ Дороговартісні, потребують специфічного обладнання
		Ювеніли		
		Пуголовки		

Алозими ЛДГ-1 в ооцитах	Геноми, що передають самиці	Дорослі	Працює частково <i>Визначення геному, але не плідності гамет</i>	++ <i>Помірні фінансові витрати</i>
		Ювеніли	– (не використовується)	
		Пуголовки	– (не використовується)	
Лабораторні схрещування	Отримання потомства, яке далі аналізують молекулярними або цитогенетичним методами.	Дорослі	Працює	++ <i>Часозатратний, вимагає специфічного обладнання та окремого приміщення</i>
		Ювеніли	– (не використовується)	
		Пуголовки	– (не використовується)	
Біоакустичний аналіз криків вивільнення	Таксономічна приналежність, плідність	Дорослі	Не працює	++ <i>Часозатратний, вимагає специфічного обладнання</i>
		Ювеніли	– (не використовується)	
		Пуголовки	– (не використовується)	
Аналіз аномалій розвитку	Таксономічна приналежність, плідність?	Дорослі	Не працює.	+++ <i>Швидкий, не потребує фінансових витрат</i>
		Ювеніли		
		Пуголовки		

Отримані результати аналізу складу трьох різних ГПС (див. розділ 5 «використання запропонованих методів для встановлення особливостей відтворення гібридів в природних ГПС») показують, що склад дорослих особин, ювенілів та пуголовків не є тотожними. Наприклад, серед пуголовків ГПС Добрицького ставу частка *P. ridibundus* була у 5 разів вища ніж серед дорослих (див. розділ 5.3 «Смертність пуголовків в R-E-Ep ГПС Нижнього Добрицького ставу»), а серед ювенілів ГПС Іськова ставу частка *P. ridibundus* була в 11 разів вища ніж серед дорослих (див. розділ 5.1 «Відтворення гібридів ГПС Іськова ставу»).

Таким чином, для комплексного розуміння складу і характеру відтворення ГПС, в тому числі того, які форми утворюються, які гинуть, а які доживають до статевої зрілості і в подальшому приймають участь розмноженні і передачі геномів потомству, необхідно аналізувати склад не тільки дорослих особин, а й пуголовків та ювенільних особин на різних стадіях розвитку. Для аналізу того, який вклад в популяційну систему вносять окремі особини, найефективнішим є проведення лабораторних схрещувань і аналіз складу отриманого потомства.

На рисунку 5.5 наведено запропонований комплекс методів для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС.

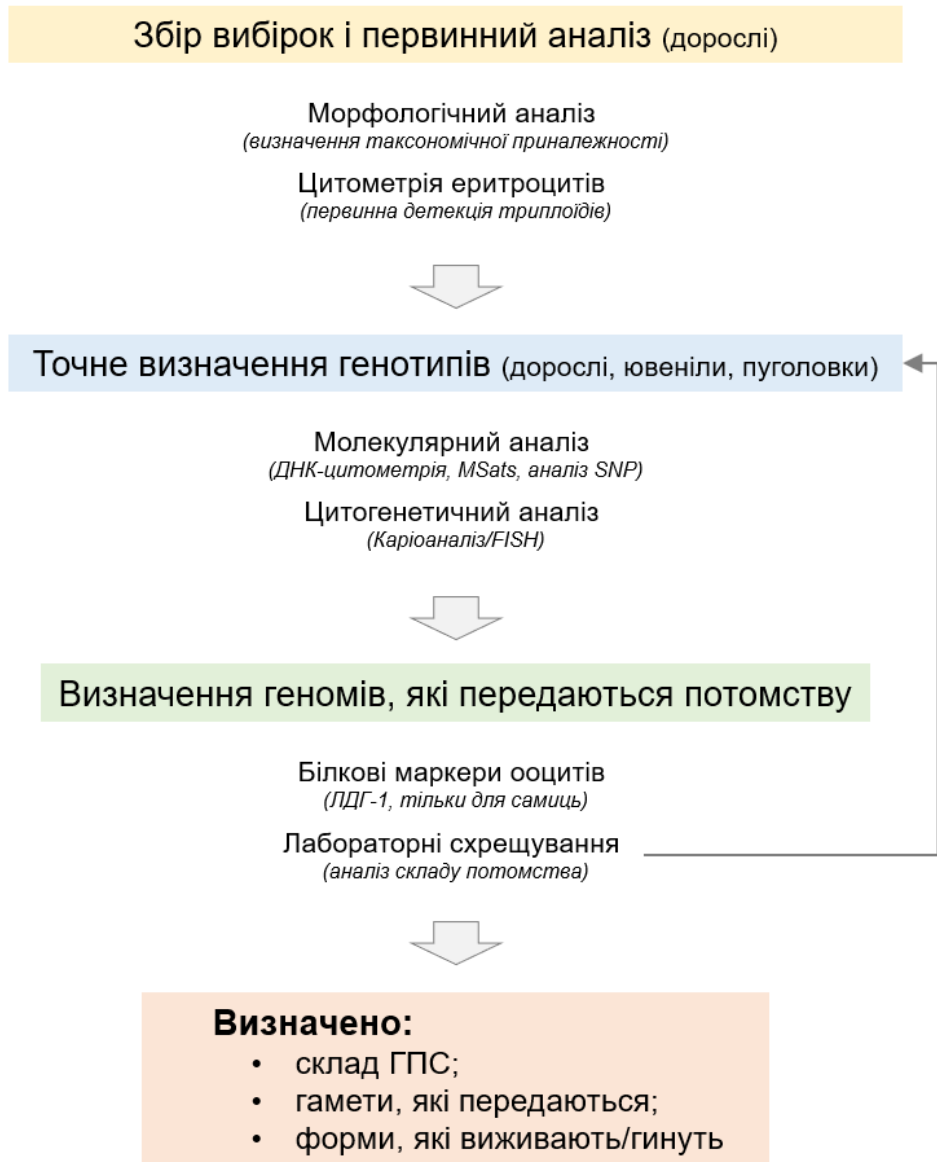


Рис. 5.5. Запропонований комплекс методів і порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС.

ВИСНОВКИ

1. Результати аналізу криків вивільнення п'яти видів зелених жаб (*P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. kurtmuelleri*, *P. epeiroticus*, *P. bergeri*), а також двох міжвидових гібридів (*P. esculentus*, *P. hispanicus*) показали, що крики вивільнення різних видів самців чітко розділяються на групи *ridibundus* (*P. ridibundus*, *P. kurtmuelleri*, *P. epeiroticus*) та *lessonae* (*P. bergeri*, *P. lessonae*), а крики вивільнення гібридів носять проміжний характер. В той час як для самиць подібна картина не була характерна: крики вивільнення більшості проаналізованих самиць змішувалися в одну групу.

Глибший аналіз великої кількості *P. ridibundus* та *P. esculentus* (диплоїди та триплоїди), що походять з декількох локалітетів Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб, також не виявив чіткої різниці між криками вивільнення батьківського виду та гібридів (обох статей), а також між криками диплоїдних та триплоїдних гібридів.

Таким чином, крики вивільнення не можуть слугувати видоспецифічним маркером для визначення таксономічної приналежності різних видів зелених жаб роду *Pelophylax*.

2. Розроблено та показано ефективність нового методу прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків, що використовує здатність пуголовків до активної регенерації тканин хвостового плавця. Запропонований метод є зручним для отримання хромосомних препаратів пуголовків, які знаходяться на ранніх стадіях розвитку, оскільки в цей момент вони мають вищий регенераційний потенціал, а також на ранніх стадіях мають недиференційовані гонади, тому не потребують розтину для визначення статі за морфологією гонад.

3. Частота зустрічання різних аномалій розвитку не відрізнялась між вибірками представників батьківського виду *P. ridibundus* та гібриду *P. esculentus*, а також не залежить від плоїдності чи статі проаналізованих

особин. Однак, різниця в кількості аномалій була зафіксована при порівнянні дорослих та ювенільних особин (суттєво вища частка аномалій зафіксована серед ювенілів в порівнянні з дорослими, що вказує на вплив даних аномалій на виживання особин).

4. Метод вимірювання розмірів еритроцитів та/або їх ядер не дозволяє встановити справжню частку триплоїдних гібридів в ГПС, показуючи зазвичай нижчу частку, оскільки зустрічаються триплоїди з малими клітинами та ядрами. Однак, даний метод може використовуватися для первинної детекції наявності триплоїдних гібридів в популяційній системі, оскільки особини зі значно великими клітинами та ядрами точно є триплоїдами. За допомогою цитометрії еритроцитів вперше показано наявність триплоїдних гібридів в Чорнобильській зоні відчуження.

5. Показано, що вплив розміру геномів на розмір сперматозоїдів потенційно нівелюється низкою інших чинників, які не можуть бути враховані в умовах практичного дослідження. Вимірювання розмірів сперматозоїдів не може бути надійним методом для ідентифікації самців, що потенційно продукують диплоїдні гамети.

6. Використано комплекс морфологічних, гібридологічного, молекулярних та цитогенетичних методів для дослідження складу, вибіркової смертності та характеру відтворення в R-E-Rp-ГПС та R-Erf-ГПС. Показано, що стабільність складу цих систем підтримується за рахунок вибіркової смертності певних генотипів серед потомства (на стадії пуголовків та під час чи після метаморфозу). Для R-E-Rp-ГПС характерна смертність потомства з генотипом RR (потенційно гібридолізні особини, що виникають від схрещування двох гібридів), тоді як в потомстві гібридних самиць з R-Erf-ГПС гинуть особини ♂LR, ♂LLR та ♀LR. Відхилено гіпотезу про те, що у відтворенні в R-E-Rp-ГПС Іськова ставу основну роль грають два амфігаметних клони. Тільки для L-геному показано наявність клональних ліній, в той час як переважна більшість мультилокусних генотипів серед R-

геномів були унікальними, що вказує на високе різноманіття R-геномів. Форми LRR та RR грають важливу роль в підтриманні складу системи.

7. Для комплексного розуміння складу і характеру відтворення ГПС необхідно комбінувати морфологічні, молекулярні, цитометричні та цитогенетичні методи для визначення генотипів не тільки дорослих особин, а й пуголовків та ювенілів на різних стадіях розвитку. Для аналізу того, який вклад в популяційну систему вносять окремі особини, найефективнішим є проведення лабораторних схрещувань і аналіз складу отриманого потомства. Запропоновано комплекс методів і порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., ... Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>
2. Alves, M., Coelho, M., & Collares-Pereira, M. (1998). 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*, 15(10), 1233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025852>
3. Arano, B., Llorente, G. A., Herrero, P., & Sanchiz, B. (1994). Current studies on Iberian water frogs. *Zoologica Poloniae*, 39(3–4), 365–375.
4. Arioli, M., Jakob, C., & Reyer, H.-U. (2010). Genetic diversity in water frog hybrids (*Pelophylax esculentus*) varies with population structure and geographic location. *Molecular Ecology*, 19(9), 1814–1828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04603.x>
5. Bachmann, K., & Nishioka, M. (1978). Genome Size and Nuclear Size in Palaearctic Frogs (*Rana*). *Copeia*, 1978(2), 225–229. <https://doi.org/10.2307/1443555>
6. Ballengée, B., & Sessions, S. K. (2009). Explanation for missing limbs in deformed amphibians. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312B(7), 770–779. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21296>
7. Barton, N. H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10(3), 551–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01216.x>

8. Berger, L. (1964). Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species? *Ann. Zool. PAN.*, 22(13), 245–261.
9. Berger, L. (1967). Embryonal and larval development of F1 generation of green frogs of different combinations. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 12, 123–160.
10. Berger, L. (1968). Morphology of the F1 generation of various crosses within *Rana esculenta*-complex. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 13, 310–324.
11. Berger, L. (1969). Systematyka żab zielonych. *Przegl. Zool.*, 13(3), 219–238.
12. Berger, L. (1970). Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development. *Annales Zoologici*, 27, 374–410.
13. Berger, L. (1971). Viability, sex and morphology of F2 generation within forms of *Rana esculenta* complex. *Zoologica Poloniae*, 21, 345–364.
14. Berger, L., & Berger, W. A. (1992). Progeny of water frog populations in central Poland. *Amphibia-Reptilia*, 13(2), 135–146. <https://doi.org/10.1163/156853892X00328>
15. Berger, L., Roguski, H., & Uzzell, T. (1978). Triploid F2 progeny of water frogs (*Rana esculenta* complex). *Folia Biologica*, 26, 135–152.
16. Berger, L., Rybacki, M., & Hotz, H. (1994). Artificial fertilization of water frogs. *Amphibia-Reptilia*, 15, 408–413. <https://doi.org/10.1163/156853894X00452>
17. Biliaiev I., Bondarenko H., Harbuz D., Drohvalenko M., Siervatovska Y., Sudarenko U., Teplenko U., Fedorova A., Shabanov D. Composition and changes of three hemiclinal population systems of water frogs from NNP “Gomilshanski lisy”. *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)*
18. Biriuk, O. V., Shabanov, D. A., Korshunov, A. V., Borkin, L. J., Lada, G. A., Pasyukova, R. A., Rosanov, J. M., & Litvinchuk, S. N. (2016). 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, 54(3), 215–225. <https://doi.org/10.1111/jzs.12132>

19. Birstein, V. J. (1982). Structural characteristics of genome organization in amphibians: Differential staining of chromosomes and DNA structure. *Journal of Molecular Evolution*, 18(2), 73–91. <https://doi.org/10.1007/BF01810826>

20. Bisconti, R. (2019). Balkan marsh frogs *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940) introduced in the Aspromonte National Park, southern Italy. *BioInvasions Records*, 8(1), 26–33. <https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.1.03>

21. Bondarieva, A. A., Bibik, Yu. S., Samilo, S. M., & Shabanov, D. A. (2012). Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex / Erythrocytes cytogenetic characteristics of green frogs from Siversky Donets centre of *Pelophylax esculentus* complex diversity (in Russian). *Вісник Харківського Національного Університету Імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*, 15, 116–123.

22. Borodin, P. M., Fedyk, S., Chętnicki, W., Torgasheva, A. A., Pavlova, S. V., & Searle, J. B. (2019). Meiosis and Fertility Associated with Chromosomal Heterozygosity. In J. Zima, J. B. Searle, & P. D. Polly (Eds.), *Shrews, Chromosomes and Speciation* (pp. 217–270). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9780511895531.008>

23. Bowcock, H., Brown, G. P., & Shine, R. (2008). Sexual communication in cane toads, *Chaunus marinus*: What cues influence the duration of amplexus? *Animal Behaviour*, 75(4), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.10.011>

24. Bowcock, H., Brown, G. P., & Shine, R. (2009). Beastly Bondage: The Costs of Amplexus in Cane Toads (*Bufo marinus*). *Copeia*, 2009(1), 29–36. <https://doi.org/10.1643/CE-08-036>

25. Bucci, S., Raghianti, M., Mancino, G., Berger, L., Hotz, H., & Uzzell, T. (1990). Lampbrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing

hybrid *Rana esculenta* and its parental species. *The Journal of Experimental Zoology*, 255(1), 37–56. <https://doi.org/10.1002/jez.1402550107>

26. Bytyutskyy, D., & Flajšhans, M. (2014). Use of diploid and triploid tench (*Tinca tinca*) blood as standards for genome size measurements. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(s1), 12–14. <https://doi.org/10.1111/jai.12422>

27. Bytyutskyy, D., Kholodnyy, V., & Flajšhans, M. (2014). 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish. *Cell Biology International*, 38(6), 708–715. <https://doi.org/10.1002/cbin.10247>

28. Cal, R. M., Vidal, S., Camacho, T., Piferrer, F., & Guitian, F. J. (2005). Effect of triploidy on turbot haematology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.03.007>

29. Carmona, J. A., Sanjur, O. I., Doadrio, I., Machordom, A., & Vrijenhoek, R. C. (1997). Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: The *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics*, 146(3), 983–993. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.3.983>

30. Castellano, S., & Rosso, A. (2006). Variation in Call Temporal Properties and Female Preferences in *Hyla intermedia*. *Behaviour*, 143(4), 405–424.

31. Castellano, S., Tontini, L., Ggiacoma, C., Lattes, A., & Balletto, E. (2002). The evolution of release and advertisement calls in green toads (*Bufo viridis* complex). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77(3), 379–391. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00118.x>

32. Chan, W. Y., Hoffmann, A. A., & van Oppen, M. J. H. (2019). Hybridization as a conservation management tool. *Conservation Letters*, 12(5), e12652. <https://doi.org/10.1111/conl.12652>

33. Chmielewska, M., Dedukh, D., Haczkiwicz, K., Rozenblut-Kościsty, B., Kaźmierczak, M., Kolenda, K., Serwa, E., Pietras-Lebioda, A., Krasikova, A., & Ogielska, M. (2018). The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax*

esculentus. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26168-z>

34. Chmielewska, M., Kaźmierczak, M., Rozenblut-Kościsty, B., Kolenda, K., Dudzik, A., Dedukh, D., & Ogielska, M. (2022). Genome elimination from the germline cells in diploid and triploid male water frogs *Pelophylax esculentus*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.1008506>

35. Christiansen, D. G. (2005). A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 190–193. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00869.x>

36. Christiansen, D. G. (2009). Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*). *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-135>

37. Christiansen, D. G., Fog, K., Pedersen, B. V., & Boomsma, J. J. (2005). Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 59(6), 1348–1361.

38. Christiansen, D. G., Jakob, C., Arioli, M., Roethlisberger, S., & Reyer, H.-U. (2010). Coexistence of diploid and triploid hybrid water frogs: Population differences persist in the apparent absence of differential survival. *BMC Ecology*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-10-14>

39. Christiansen, D. G., & Reyer, H.-U. (2009). From clonal to sexual hybrids: Genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 63(7), 1754–1768. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00673.x>

40. Christiansen, D. G., & Reyer, H.-U. (2011). Effects of geographic distance, sea barriers and habitat on the genetic structure and diversity of all-hybrid

water frog populations. *Heredity*, 106(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.37>

41. Cimino, M. C. (1972). Egg-Production, Polyploidization and Evolution in a Diploid All-Female Fish of the Genus *Poeciliopsis*. *Evolution*, 26(2), 294–306. <https://doi.org/10.2307/2407039>

42. Cocroft, R. B., & Ryan, M. J. (1995). Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*, 49(2), 283–303. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0043>

43. Comeault, A. A., & Matute, D. R. (2018). Genetic divergence and the number of hybridizing species affect the path to homoploid hybrid speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(39), 9761–9766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809685115>

44. Conklin, E. G. (1912). Cell size and nuclear size. *Journal of Experimental Zoology*, 12(1), 1–98. <https://doi.org/10.1002/jez.1400120102>

45. Davies, N. B., & Halliday, T. R. (1978). Deep croaks and fighting assessment in toads *Bufo bufo*. *Nature*, 274(5672), 683–685. <https://doi.org/10.1038/274683a0>

46. Dawley, R. M. (1989). Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. (*No Title*), 1.

47. Dedukh, D., & Krasikova, A. (2022). Delete and survive: Strategies of programmed genetic material elimination in eukaryotes. *Biological Reviews*, 97(1), 195–216. <https://doi.org/10.1111/brv.12796>

48. Dedukh, D., Litvinchuk, S., Rosanov, J., Mazepa, G., Saifitdinova, A., Shabanov, D., & Krasikova, A. (2015). Optional Endoreplication and Selective Elimination of Parental Genomes during Oogenesis in Diploid and Triploid Hybrid European Water Frogs. *PLOS ONE*, 10(4), e0123304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123304>

49. Dedukh, D., Litvinchuk, S., Rosanov, J., Shabanov, D., & Krasikova, A. (2017). Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in

R-E systems: Results from artificial crossings experiments. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1063-3>

50. Dedukh, D., Mazepa, G., Shabanov, D., Rosanov, J., Litvinchuk, S., Borkin, L., Saifitdinova, A., & Krasikova, A. (2013). Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine. *BMC Genetics*, 14, 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-26>

51. Dedukh, D., Riumin, S., Chmielewska, M., Rozenblut-Kościsty, B., Kolenda, K., Kaźmierczak, M., Dudzik, A., Ogielska, M., & Krasikova, A. (2020). Micronuclei in germ cells of hybrid frogs from *Pelophylax esculentus* complex contain gradually eliminated chromosomes. *Scientific Reports*, 10(1), 8720. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64977-3>

52. Densmore, C. L., & Green, D. E. (2007). Diseases of Amphibians. *ILAR Journal*, 48(3), 235–254. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.235>

53. Drohvalenko M., **Fedorova A.** (2022) The first evidence of triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone. *Bonn Zoological Bulletin*. 71(2): 105-108. <https://doi.org/10.20363/BZB-2022.71.2.105>

54. Drohvalenko M., Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. (2021) First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh river basin (Kharkiv region, Ukraine). *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 23 (2): 61-67. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>

55. Drohvalenko, M. O., Fedorova A. O., Pustovalova E. S., Mikulíček P. Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclonal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).

56. Drohvalenko M., **Fedorova A.**, Pustovalova E. *Pelophylax esculentus* complex from Iskiv pond: one more step of long-term monitoring. “*Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of*

protected areas”. *International Zoological Conference. (September 12-15, 2019, Lviv, Shatsk, Ukraine)*

57. Drohvalenko M. O., Kravchenko M. O., Makarian R. M, Stepanyuk Ya. V. **Fedorova A. O.**, Shabanov D.A. Selective genetic and environmental mortality of different representatives of water frogs’ hybridogenic complex provides the stability of their hemiclinal population systems. Regional aspects of floristic and faunistic research. *Fifth international scientific and practical conference (April 19-20, 2018, Chernivtsi, Ukraine)*

58. Doležálková, M., Sember, A., Marec, F., Ráb, P., Plötner, J., & Choleva, L. (2016). Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? *BMC Genetics*, 17(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0408-z>

59. Doležálková-Kaštánková, M., Mazepa, G., Jeffries, D. L., Perrin, N., Plötner, M., Plötner, J., Guex, G.-D., Mikulíček, P., Poustka, A. J., Grau, J., & Choleva, L. (2021). Capture and return of sexual genomes by hybridogenetic frogs provides clonal genome enrichment in a sexual species. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81240-5>

60. Doležálková-Kaštánková, M., Pruvost, N. B. M., Plötner, J., Reyer, H.-U., Janko, K., & Choleva, L. (2018). All-male hybrids of a tetrapod *Pelophylax esculentus* share its origin and genetics of maintenance. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0172-z>

61. Drohvalenko, M. (2021). Tadpole morphology features of different *Pelophylax esculentus* complex forms. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 37, 51–64. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-4>

62. Drohvalenko, M., Pustovalova, E., Fedorova, A., & Shabanov, D. (2022). First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh river basin (Kharkiv region, Ukraine). *Biodiversity, Ecology and Experimental Biology*, 23(2), Article 2. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>

63. Dubois, A. (1979). Anomalies and Mutations in Natural Populations of the *Rana* “*esculenta*” Complex (Amphibia, Anura). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologisches Museum und Institut für Spezielle Zoologie, Berlin*, 55(1), 59–87. <https://doi.org/10.1002/mmnz.4830550108>
64. Dufresnes, C., Bonato, L., Novarini, N., Betto-Colliard, C., Perrin, N., & Stöck, M. (2014). Inferring the degree of incipient speciation in secondary contact zones of closely related lineages of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Heredity*, 113(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.26>
65. Dufresnes, C., & Mazepa, G. (2020). Hybridogenesis in Water Frogs. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 718–726). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029090>
66. Edens, L. J., White, K. H., Jevtic, P., Li, X., & Levy, D. L. (2013). Nuclear size regulation: From single cells to development and disease. *Trends in Cell Biology*, 23(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.11.004>
67. Fankhauser, G. (1945). Maintenance of normal structure in heteroploid salamander larvae, through compensation of changes in cell size by adjustment of cell number and cell shape. *Journal of Experimental Zoology*, 100(3), 445–455. <https://doi.org/10.1002/jez.1401000310>
68. Fedorova, A., & Shabanov, D. (2022). Differences in release calls of the hybrid water frog *Pelophylax esculentus* and its parental species *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) in Ukraine. *Biologia*, 78(2), 497–504. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01256-8>
69. Fedorova A., Pustovalova E., Drohvalenko M. (2023) High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetological Bulletin*. 164, 24-25 DOI: <https://doi.org/10.33256/hb164.2425>
70. Fedorova A., Shabanov D. (2022) Genomes diversity in oocytes of hybrid water frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in hemiclinal population systems from Ukraine. *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 24(1): 25-29.

71. Fedorova A., Pustovalova E. (2021) What the distribution of sperm size can tell about the stability of spermatogenesis in hybrid frogs *Pelophylax esculentus*. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 37(2): 70-78. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-6>
72. Fedorova A. Diversity of frog release calls in the genus *Pelophylax*. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).
73. Fedorova A. Repeat study on ploidy of tadpoles from lower Dobrytskyi pond. *SymBioSE-2019 (July 29 – August 6, Glasgow, Scotland)*
74. Fedorova A., Pustovalova E. Results of artificial crossing expand data about reproduction and composition of unusual population system (*Pelophylax esculentus* complex). *Open Readings. 62nd International conference for students of physics and natural sciences. (March 19-22, 2019, Vilnius, Lithuania)*
75. Fedorova A. O., Drohvalenko M. O., Pustovalova E. S. Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond. *Abstract book of the Conference of young zoologists (November 14-15, 2018, Kyiv, Ukraine)*
76. Forzán, M. J., Vanderstichel, R. V., Ogbuah, C. T., Barta, J. R., & Smith, T. G. (2012). Blood Collection from the Facial (Maxillary)/Musculo-Cutaneous Vein in True Frogs (Family Ranidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 176–180. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.176>
77. Freitas, S., Rocha, S., Campos, J., Ahmadzadeh, F., Corti, C., Sillero, N., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Arakelyan, M., Harris, D. J., & Carretero, M. A. (2016). Parthenogenesis through the ice ages: A biogeographic analysis of Caucasian rock lizards (genus *Darevskia*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.035>
78. Freitas, S., Westram, A. M., Schwander, T., Arakelyan, M., Ilgaz, Ç., Kumlutas, Y., Harris, D. J., Carretero, M. A., & Butlin, R. K. (2022). Parthenogenesis in *Darevskia* lizards: A rare outcome of common hybridization, not

a common outcome of rare hybridization. *Evolution*, 76(5), 899–914.
<https://doi.org/10.1111/evo.14462>

79. Hertwig G., & Hertwig, P. (1920). Triploide Froschlarven. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 94(1), 34–54. <https://doi.org/10.1007/BF02977283>

80. Gall, J. G., Murphy, C., Callan, H. G., & Wu, Z. (1991). Chapter 8 Lampbrush Chromosomes. In B. K. Kay & H. B. Peng (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 36, pp. 149–166). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60276-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60276-9)

81. Gans, C. (1973). Sound Production in the Salientia: Mechanism and Evolution of the Emitter. *American Zoologist*, 13(4), 1179–1194. <https://doi.org/10.1093/icb/13.4.1179>

82. Garda, A. A., Pedro, V. de A. S., & Lion, M. B. (2010). The Advertisement and Release Calls of *Rhinella jimi* (Anura, Bufonidae). *South American Journal of Herpetology*, 5(2), 151–156. <https://doi.org/10.2994/057.005.0209>

83. Garner, T. W. J., Gautschi, B., RÖthlisberger, S., & Reyer, H.-U. (2000). A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology*, 9(12), 2173–2175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.105311.x>

84. Gerhardt, H. C. (1974). The Vocalizations of Some Hybrid Treefrogs: Acoustic and Behavioral Analyses. *Behaviour*, 49(1/2), 130–151.

85. Gerhardt, H. C. (1991). Female mate choice in treefrogs: Static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42(4), 615–635. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80245-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80245-3)

86. Gerhardt, H. C., Guttman, S. I., & Karlin, A. A. (1980). Natural Hybrids between *Hyla cinerea* and *Hyla gratiosa*: Morphology, Vocalization and Electrophoretic Analysis. *Copeia*, 1980(4), 577–584. <https://doi.org/10.2307/1444432>

87. Gerhardt, H. C., & Huber, F. (2002). *Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions*. University of Chicago Press. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/A/bo3634687>
88. Gingras, B., Boeckle, M., Herbst, C. T., & Fitch, W. T. (2013). Call acoustics reflect body size across four clades of anurans. *Journal of Zoology*, 289(2), 143–150. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00973.x>
89. Giorgi, F., & Galleni, L. (1972). The Lampbrush Chromosomes of *Rana esculenta* L. (Amphibia—Anura). *Caryologia*, 25(2), 107–123. <https://doi.org/10.1080/00087114.1972.10796470>
90. Goddard, K., Megwinoff, O., Wessner, L., & Giaimo, F. (1998). Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Journal of Heredity*, 89(2), 151–157. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.2.151>
91. Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
92. Gregory, T. R. (2001). The bigger the C-value, the larger the cell: Genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 27(5), 830–843. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0457>
93. Gregory, T. R. (2005). The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of Botany*, 95(1), 133–146. <https://doi.org/10.1093/aob/mci009>
94. Grenat, P. R., & Martino, L. (2013). The release call as a diagnostic character between cryptic related species *Odontophrynus cordobae* and *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa*, 3635(5), Article 5. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3635.5.8>
95. Guerra, C., Baldo, D., Rosset, S., Borteiro, C., & Kolenc, F. (2011). Advertisement and release calls in Neotropical toads of the *Rhinella granulosa* group and evidence of natural hybridization between *R. bergi* and *R. major* (Anura: Bufonidae). *Zootaxa*, 3092(1), Article 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3092.1.2>
96. Guex, G.-D., Hotz, H., & Semlitsch, R. D. (2002). Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclinal frogs. *Evolution*;

International Journal of Organic Evolution, 56(5), 1036–1044. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01414.x>

97. Günther, R. (1978). Zur Larvenmorphologie von *Rana ridibunda* Pall., *R. lessonae* Cam. Und Deren Bastard *R. "esculenta"* L. (Anura, Ranidae). *Mitteilungen Aus Dem Museum Für Naturkunde in Berlin. Zoologisches Museum Und Institut Für Spezielle Zoologie (Berlin)*, 54(1), 161–179. <https://doi.org/10.1002/mmnz.19780540107>

98. Günther, R., & Plötner, J. (1988). Zur Problematik der klonalen Vererbung bei *Rana* kl. *esculenta* (Anura). *Beiträge Zur Biologie Und Bibliographie (1960–1987) Der Europäischen Wasserfrösche*, 1, 23–46.

99. Haczkiwicz, K., & Ogielska, M. (2013). Gonadal Sex Differentiation in Frogs: How Testes Become Shorter than Ovaries. *Zoological Science*, 30(2), 125–134. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.125>

100. Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT

101. Hara, Y., & Kimura, A. (2009). Cell-Size-Dependent Spindle Elongation in the *Caenorhabditis elegans* Early Embryo. *Current Biology*, 19(18), 1549–1554. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.050>

102. Hauswaldt, J. S., Höer, M., Ogielska, M., Christiansen, D. G., Dziejulska-Szwajkowska, D., Czernicka, E., & Vences, M. (2012). A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). *Molecular Ecology Resources*, 12(5), 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x>

103. Henle, K., Dubois, A., Rimpp, K., & Vershinin, V. (2017). Mass anomalies in green toads (*Bufo viridis*) at a quarry in Roßwag, Germany: Inbred hybrids, radioactivity or an unresolved case? *Mertensiella*, 25, 185–242.

104. Henle, K., Dubois, A., & Vershinin, V. (2017). A review of anomalies in natural populations of amphibians and their potential causes. *Mertensiella*, 25, 97–164.
105. Heppich, S. (1978). Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 16(1), 27–39. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1978.tb00918.x>
106. Heppich, S., Tunner, H. G., & Greilhuber, J. (1982). Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta*. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(2), 101–104. <https://doi.org/10.1007/BF00273874>
107. Herczeg, D., Vörös, J., Christiansen, D. G., Benovics, M., & Mikulíček, P. (2017). Taxonomic composition and ploidy level among European water frogs (Anura: Ranidae: Pelophylax) in eastern Hungary. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 55(2), 129–137. <https://doi.org/10.1111/jzs.12158>
108. Hermaniuk, A., Czajkowska, M., Borkowska, A., & Taylor, J. R. E. (2020). Body size variation in hybrids among populations of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) with different breeding systems. *Amphibia-Reptilia*, 41(3), 361–371. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10005>
109. Hermaniuk, A., Pruvost, N. B. M., Kierzkowski, P., & Ogielska, M. (2013). Genetic and Cytogenetic Characteristics of Pentaploidy in Water Frogs. *Herpetologica*, 69(1), 36–45. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00037>
110. Hertwig, K. (1903). Ueber die Korrelation von Zell-und Kerngrösse und ihre Bedeutung für die Geschlechtliche Differenzierung und die Teilung der Zelle. *Biologisches Centralblatt*, 23, 49–62.
111. Hoffmann, A., Plötner, J., Pruvost, N. B. M., Christiansen, D. G., Röthlisberger, S., Choleva, L., Mikulíček, P., Cogălniceanu, D., Sas-Kovács, I., Shabanov, D., Morozov-Leonov, S., & Reyer, H.-U. (2015). Genetic diversity and

distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe. *Molecular Ecology*, 24(17), 4371–4391. <https://doi.org/10.1111/mec.13325>

112. Hoffmann, A., & Reyer, H.-U. (2013). Genomic effects on advertisement call structure in diploid and triploid hybrid waterfrogs (*Anura*, *Pelophylax esculentus*). *BMC Ecology*, 13, 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-47>

113. Hotz, H., Uzzell, T., Guex, G.-D., Alpers, D., Semlitsch, R. D., & Beerli, P. (2001). Microsatellites: A tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 43–50. <https://doi.org/10.1002/mmnz.20010770108>

114. Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>

115. Jakob, C., & Arioli, M. (2007). Occurrence and survival of offspring genotypes in a pure hybrid population of *Rana esculenta*: An experimental approach. In *Structure and Dynamics of Pure Hybridogenetic Water Frog Populations of Rana esculenta in Southern Sweden* (pp. 136–166).

116. Johnson, P. T., Lunde, K. B., Haight, R. W., Bowerman, J., & Blaustein, A. R. (2001). *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in western toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology*, 79(3), 370–379.

117. Johnson, P. T., Lunde, K. B., Thurman, E. M., Ritchie, E. G., Wray, S. N., Sutherland, D. R., Kapfer, J. M., Frest, T. J., Bowerman, J., & Blaustein, A. R. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs*, 72(2), 151–168.

118. Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupeš, I., Tyers, M., & Fitcher, B. (2007). The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9), 3523–3532. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-10-0973>

119. Katrushenko, S. (2020). External morphological anomalies of the amphibians of the Kharkiv region. *Вісник Харківського Національного Університету Імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*, 34, 78–88.
120. Kierzkowski, P., Kosiba, P., Rybacki, M., Socha, M., & Ogielska, M. (2013). Genome dosage effect and colouration features in hybridogenetic water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex. *Amphibia-Reptilia*, 34(4), 493–504. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002904>
121. King, M. (1995). *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press.
122. Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C. F. B., Rödel, M.-O., & Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1), Article 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>
123. Koref-Santibacez, S., & Gunther, R. (1980). Karyological and serological studies in *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and in their hybrid *R. "esculenta"* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 52/53, 195–207.
124. Kryvoltsevych A., Fedorova A., Shabanov D., Pustovalova E. (2022) Anomalies in Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) and hybrid waterfrogs (*P. esculentus*) (Anura: Ranidae) from two ponds in the Kharkiv Region of Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 29(1): 204-209. <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.16446>
125. Leary, C. J. (1999). Comparison between Release Vocalizations Emitted during Artificial and Conspecific Amplexus in *Bufo americanus*. *Copeia*, 1999(2), 506–508. <https://doi.org/10.2307/1447500>
126. Leggatt, R. A., & Iwama, G. K. (2003). Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(3), 237–246. <https://doi.org/10.1023/B:RFBF.0000033049.00668.fe>
127. Levy, D. L., & Heald, R. (2010). Nuclear Size Is Regulated by Importin α and Ntf2 in *Xenopus*. *Cell*, 143(2), 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.012>

128. Levy, D. L., & Heald, R. (2016). Biological Scaling Problems and Solutions in Amphibians. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), a019166. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019166>
129. Lunde, K. B., & Johnson, P. T. J. (2012). A Practical Guide for the Study of Malformed Amphibians and Their Causes. *Journal of Herpetology*, 46(4), 429–441.
130. Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthou, G., Tsigenopoulos, C. S., Magoulas, A., & Mylonas, M. (2007). Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.009>
131. Mable, B. K., & Bogart, J. P. (1991). Call Analysis of Triploid Hybrids Resulting from Diploid-Tetraploid Species Crosses of Hylid Tree Frogs. *Bioacoustics*, 3(2), 111–119. <https://doi.org/10.1080/09524622.1991.9753167>
132. Macgregor, H. C. (1984). Lampbrush chromosomes and gene utilization in meiotic prophase. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 38, 333–347.
133. Macgregor, H. C., & Varley, J. M. (1988). *Working with Animal Chromosomes*. Wiley.
134. Majtánová, Z., Dedukh, D., Choleva, L., Adams, M., Ráb, P., Unmack, P. J., & Ezaz, T. (2021). Uniparental Genome Elimination in Australian Carp Gudgeons. *Genome Biology and Evolution*, 13(6), evab030. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab030>
135. Mantovani, B., & Scali, V. (1992). Hybridogenesis and androgenesis in the stick-insect bacillus *Rossius-grandii benazzii* (Insecta, Phasmatodea). *Evolution*, 46(3), 783–796. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb02084.x>
136. Marquez, R., & Eekhout, X. R. (2006). Advertisement calls of six species of anurans from Bali, Republic of Indonesia. *Journal of Natural History*, 40(9–10), 571–588. <https://doi.org/10.1080/00222930600712129>

137. Marracci, S., Michelotti, V., Guex, G.-D., Hotz, H., Uzzell, T., & Raghianti, M. (2011). RrS1-like Sequences of Water Frogs from Central Europe and Around the Aegean Sea: Chromosomal Organization, Evolution, Possible Function. *Journal of Molecular Evolution*, 72(4), 368–382. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9436-5>
138. Marta, A., Tichopád, T., Bartoš, O., Klíma, J., Shah Mujahid, Vendula, B. Š., Bohlen, J., Halačka, K., Choleva, L., Stöck, M., Dedukh, D., & Janko, K. (2023). Genetic and karyotype divergence between parents affect clonality and sterility in hybrids. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.88366>
139. Marushchak, O. Y., & Muravynets, O. (2018). Morphological abnormalities in tailless amphibians (Amphibia, Anura) in Ukraine. *Geo&Bio*, 2018(16), 76–82. <https://doi.org/10.15407/gb.2018.16.076>
140. Marushchak, O. Y., Nekrasova, O. D., Tytar, V. M., Smirnov, N. A., Korshunov, O. V., Pupins, M., Mykytynets, G. I., Skute, A., Henle, K., & Kaiser, H. (2021). A GIS approach to the study of colour anomalies in amphibians of Ukraine reveals the deleterious effect of human impacts. *Herpetology Notes*, 14, 1239–1251.
141. Maxime, V., & Labbé, L. (2010). The effect of ploidy and sexual maturation on the resistance of erythrocytes to haemolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 305(1), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.016>
142. Melaragno, J., Mehrotra, B., & Coleman, A. (1993). Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 5(11), 1661–1668.
143. Meleshko, O. V., Korshunov, O. V., & Shabanov, D. A. (2014). The study of three hemiclinal population systems of *Pelophylax esculentus* complex from the Seversko-Donetskiy center of green frogs' diversity. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*, 20(1100), 153–158.
144. Meteyer, C. U. (2000). Field guide to malformations of frogs and toads: With radiographic interpretations. In *Biological Science Report* (2000–0005). U.S. Geological Survey. <https://pubs.usgs.gov/publication/53882>

145. Mikulíček, P., Kautman, M., Kautman, J., & Pruvost, N. B. M. (2015). Mode of hybridogenesis and habitat preferences influence population composition of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex, Anura: Ranidae) in a region of sympatric occurrence (western Slovakia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(2), 124–132. <https://doi.org/10.1111/jzs.12083>
146. Mikulíček, P., & Kotlík, P. (2001). Two water frog populations from western Slovakia consisting of diploid females and diploid and triploid males of the hybridogenetic hybrid *Rana esculenta* (Anura, Ranidae). *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 59–64. <https://doi.org/10.1002/mmnz.20010770110>
147. Mitsuru, K. (1981). Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 69(4), 771–775. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(81\)90170-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(81)90170-5)
148. Morgan, G. T. (2002). Lampbrush chromosomes and associated bodies: New insights into principles of nuclear structure and function. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 10(3), 177–200. <https://doi.org/10.1023/a:1015227020652>
149. Mueller, R. L. (2015). Genome Biology and the Evolution of Cell-Size Diversity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11), a019125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019125>
150. Nekrasova, O. D., & Kuibida, V. V. (2018). Researching Malformations in Frogs of the *Pelophylax esculentus* Complex (Amphibia: Anura) in the Natural Populations of the Trakhtemyriv Peninsula (Ukraine). *KnE Life Sciences*, 117–122. <https://doi.org/10.18502/cls.v4i3.2112>
151. Neumann, F. R., & Nurse, P. (2007). Nuclear size control in fission yeast. *Journal of Cell Biology*, 179(4), 593–600. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708054>
152. Niide, T., Asari, S., Kawabata, K., & Hara, Y. (2022). Specificity of Nuclear Size Scaling in Frog Erythrocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 857862. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.857862>

153. Ogielska, M. (2009). *Reproduction of Amphibians*. CRC Press.
154. Ogielska, M., Kazana, K., & Kierzkowski, P. (2001). DNA content in erythrocyte nuclei of water frogs from a pure *Rana esculenta* population in Dębki (Gdańsk district, Poland). *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 65–70. <https://doi.org/10.1002/mmzn.20010770111>
155. Ogielska, M., Kierzkowski, P., & Rybacki, M. (2004). DNA content and genome composition of diploid and triploid water frogs belonging to the *Rana esculenta* complex (Amphibia, Anura). *Canadian Journal of Zoology*, 82(12), 1894–1901. <https://doi.org/10.1139/z04-188>
156. Ogielska-Nowak, M. (1978). DNA content in erythrocyte nuclei of diploid and triploid green frog hybrid of *Rana esculenta* L. complex. *Zoologica Poloniae*, 27, 109–115.
157. Pagano, A. (2001). Protein electrophoresis of water frog embryos and tadpoles as a tool of taxonomic identification. *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 23–24. <https://doi.org/10.1002/mmzn.20010770104>
158. Pagano, A., Crochet, P. A., Graf, J.-D., Joly, P., & Lodé, T. (2001). Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology and Biogeography*, 10(4), 433–441. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.2001.00246.x>
159. Pagano, Lodé, & Crochet. (2001). New contact zone and assemblages among water frogs of Southern France. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 39(1–2), 63–67. <https://doi.org/10.1046/j.14390469.2001.00156.x>
160. Patrelle, C., Ohst, T., Picard, D., Pagano, A., Sourice, S., Dallay, M.-G., & Plötner, J. (2011). A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02905.x>
161. Payseur, B. A., & Rieseberg, L. H. (2016). A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology*, 25(11), 2337–2360. <https://doi.org/10.1111/mec.13557>

162. Pinelli, C., Santillo, A., Chieffi Baccari, G., Falvo, S., & Di Fiore, M. M. (2019). Effects of chemical pollutants on reproductive and developmental processes in Italian amphibians. *Molecular Reproduction and Development*, 86(10), 1324–1332. <https://doi.org/10.1002/mrd.23165>
163. Plötner, J. (2005). *Die westpaläarktischen Wasserfrösche. Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation.*
164. Plötner, J., & Klinkhardt, M. (1992). Investigations on the genetic structure and the morphometry of a pure hybrid population of *Rana kl. esculenta* (Anura, Ranidae) in North Germany. *Zoologischer Anzeiger*. 229(3–4), 163–184.
165. Plötner, J., Köhler, F., Uzzell, T., Beerli, P., Schreiber, R., Guex, G.-D., & Hotz, H. (2009). Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.07.037>
166. Polls Pelaz, M. (1994). Modes of gametogenesis among kleptons of the hybridogenetic water frog complex: An evolutionary synthesis. *Zoologica Poloniae*, 39(3–4). <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-754c5055-9d54-4d9f-9664-b8e315534930>
167. Pruvost, N. B. M., Hoffmann, A., & Reyer, H.-U. (2013). Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (*Pelophylax esculentus*). *Ecology and Evolution*, 3(9), 2933–2946. <https://doi.org/10.1002/ece3.687>
168. Pruvost, N. B. M., Mikulíček, P., Choleva, L., & Reyer, H.-U. (2015). Contrasting reproductive strategies of triploid hybrid males in vertebrate mating systems. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(1), 189–204. <https://doi.org/10.1111/jeb.12556>
169. Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. (2022) Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue of tadpoles' tail tips. *Journal of Vertebrate Biology*, 71(22010): 1

170. Pustovalova, E., Choleva, L., Shabanov, D., & Dedukh, D. (2022). The high diversity of gametogenic pathways in amphispemic water frog hybrids from Eastern Ukraine. *PeerJ*, *10*, e13957. <https://doi.org/10.7717/peerj.13957>
171. Pustovalova E., Fedorova A., Pereslavska K., Verchoturova P. Hemiclonal population system of water frogs in Lower Dobrytskyi pond: results of annual monitoring. *14th International young scientists' conference "Biology: From a Molecule Up to The Biosphere"* (November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine)
172. Ragghianti, M., Guerrini, F., Bucci, S., Mancino, G., Hotz, H., Uzzell, T., & Guex, G.-D. (1995). Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species. *Chromosome Research*, *3*(8), 497–506. <https://doi.org/10.1007/BF00713965>
173. Reyer, H.-U., Arioli-Jakob, C., & Arioli, M. (2015). Post-zygotic selection against parental genotypes during larval development maintains all-hybrid populations of the frog *Pelophylax esculentus*. *BMC Evolutionary Biology*, *15*, 131. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0404-3>
174. Reyer, H.-U., Niederer, B., & Hettyey, A. (2003). Variation in fertilisation abilities between hemiclinal hybrid and sexual parental males of sympatric water frogs (*Rana lessonae*, *R. esculenta*, *R. ridibunda*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *54*(3), 274–284. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0635-y>
175. Roberts, J. D. (2010). Natural Hybrid between the Frogs *Crinia pseudinsignifera* and *Crinia subinsignifera* (Myobatrachidae) from Southwestern Australia Defined by Allozyme Phenotype and Call. *Journal of Herpetology*, *44*(4), 654–657.
176. Saitoh, K., Kim, I.-S., & Lee, E.-H. (2004). Mitochondrial gene introgression between spined loaches via hybridogenesis. *Zoological Science*, *21*(7), 795–798. <https://doi.org/10.2108/zsj.21.795>
177. Schmeller, D., Crivelli, A., & Veith, M. (2001). Is triploidy indisputably determinable in hybridogenetic hybrids by planimetric analyses of erythrocytes?

Zoosystematics and Evolution, 77(1), 71–77. <https://doi.org/10.1002/mmzn.20010770112>

178. Schmidt, D. J., Bond, N. R., Adams, M., & Hughes, J. M. (2011). Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris*: Eleotridae). *Molecular Ecology*, 20(16), 3367–3380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05206.x>

179. Schultz, R. J. (1967). Gynogenesis and Triploidy in the Viviparous Fish *Poeciliopsis*. *Science*, 157(3796), 1564–1567. <https://doi.org/10.1126/science.157.3796.1564>

180. Schultz, R. J. (1969). Hybridization, Unisexuality, and Polyploidy in the Teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and Other Vertebrates. *The American Naturalist*, 103(934), 605–619. <https://doi.org/10.1086/282629>

181. Semlitsch, R. D., & Reyer, H. (1992). Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: Interactions with pond drying and interspecific competition. *Evolution*, 46(3), 665–676. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb02074.x>

182. Sessions, S. K., & Ruth, S. B. (1990). Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 254(1), 38–47. <https://doi.org/10.1002/jez.1402540107>

183. Shabanov, D., Vladymyrova, M., Leonov, A., Biriuk, O., Kravchenko, M., Mair, Q., Meleshko, O., Newman, J., Usova, O., & Zholtkevych, G. (2020). Simulation as a Method for Asymptotic System Behavior Identification (e.g. Water Frog Hemiclonal Population Systems). In V. Ermolayev, F. Mallet, V. Yakovyna, H. C. Mayr, & A. Spivakovsky (Eds.), *Information and Communication Technologies in Education, Research, and Industrial Applications* (pp. 392–414). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39459-2_18

184. Shabanov V., Kryvoltsevych A., Zhadan A., Podpryatov O., Fedorova A., Drohvalenko M., Pustovalova E. Monitoring of the state of HPS of water frogs located in Lower Dobrytskyi pond. *Status and biodiversity of the ecosystems of*

Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2021, Shatsk, Ukraine)

185. Stöck, M., Steinlein, C., Lamatsch, D. K., Schartl, M., & Schmid, M. (2005). Multiple origins of tetraploid taxa in the Eurasian *Bufo viridis* subgroup. *Genetica*, 124(2), 255–272. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-3085-9>

186. Stöck, M., Ustinova, J., Betto-Colliard, C., Schartl, M., Moritz, C., & Perrin, N. (2012). Simultaneous Mendelian and clonal genome transmission in a sexually reproducing, all-triploid vertebrate. *Proceedings. Biological Sciences*, 279(1732), 1293–1299. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1738>

187. Stöck, M., Ustinova, J., Lamatsch, D. K., Schartl, M., Perrin, N., & Moritz, C. (2010). A vertebrate reproductive system involving three ploidy levels: Hybrid origin of triploids in a contact zone of diploid and tetraploid palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 64(4), 944–959. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00876.x>

188. Stopper, G. F., Hecker, L., Franssen, R. A., & Sessions, S. K. (2002). How trematodes cause limb deformities in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 294(3), 252–263. <https://doi.org/10.1002/jez.10173>

189. Sullivan, B. K., & Wagner, W. E. (1988). Variation in Advertisement and Release Calls, and Social Influences on Calling Behavior in the Gulf Coast Toad (*Bufo valliceps*). *Copeia*, 1988(4), 1014–1020. <https://doi.org/10.2307/1445726>

190. Suriadna, N., Mykytynets, G., Pupiňš, M., & Gasso, V. (2020). Population Systems Of Eurasian Water Frogs (*Pelophylax*) In The South Of Ukraine. *Biosystems Diversity*, 28(2), Article 2.

191. Sztatecsny, M., Jehle, R., Burke, T., & Hödl, W. (2006). Female polyandry under male harassment: The case of the common toad (*Bufo bufo*). *Journal of Zoology*, 270(3), 517–522. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00120.x>

192. Szydłowski, P., Chmielewska, M., Rozenblut-Kościsty, B., & Ogielska, M. (2017). The frequency of degenerating germ cells in the ovaries of water frogs

(*Pelophylax esculentus* complex). *Zoomorphology*, 136(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s00435-016-0337-4>

193. Tada, D., Martino, & Sinsch. (2001). Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): Ecological constraints and phylogenetic implications. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 39(1–2), 13–23. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2001.00147.x>

194. Taylor, B., Skelly, D., Demarchis, L. K., Slade, M. D., Galusha, D., & Rabinowitz, P. M. (2005). Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb Malformation. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), 1497–1501. <https://doi.org/10.1289/ehp.7585>

195. Tecker, A., Göcking, C., Menke, N., Schreiber, R., & Plötner, J. (2017). Neue Daten zur Morphologie, Genetik und Verbreitung der Wasserfrösche (*Pelophylax* spp.) im Münsterland (NRW) unter besonderer Berücksichtigung des Kleinen Wasserfroschs (*Pelophylax lessonae*).

196. Tobias, M. L., Korsh, J., & Kelley, D. B. (2014). Evolution of male and female release calls in African clawed frogs. *Behaviour*, 151(9), 1313–1334. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003186>

197. Tunner, H. G. (1973). Das Albumin und andere Bluteiweiße bei *Rana ridibunda* Pallas, *Rana lessonae* Camerano, *Rana esculenta* Linné und deren Hybriden. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 11(1), 219–233. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1973.tb00143.x>

198. Tunner, H. G., & Heppich, S. (1981). Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften*, 68(4), 207–208. <https://doi.org/10.1007/BF01047207>

199. Tunner, H. G., & Heppich-Tunner, S. (1991). Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog. *Naturwissenschaften*, 78(1), 32–34. <https://doi.org/10.1007/BF01134041>

200. Uzzell, T., & Berger, L. (1975). Electrophoretic Phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and Their Hybridogenetic Associate, *Rana esculenta*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 127, 13–24.

201. Uzzell, T. M. (1964). Relations of the Diploid and Triploid Species of the *Ambystoma jeffersonianum* Complex (Amphibia, Caudata). *Copeia*, 1964(2), 257–300. <https://doi.org/10.2307/1441023>
202. Verrell, P. A., & McCabe, N. R. (1986). Mating Balls in the Common Toad, *Bufo bufo*. *The Herpetological Bulletin*, 16. <https://www.thebhs.org/publications/the-herpetological-bulletin/issue-number-16-summer-1986/2243-hb016-05>
203. Vinogradov, A. E., Borkin, L. J., Günther, R., & Rosanov, J. M. (1990). Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: Cytological evidence from DNA flow cytometry. *Genome*, 33(5), 619–627. <https://doi.org/10.1139/g90-092>
204. Vinogradov, A. E., Borkin, L. J., Günther, R., & Rosanov, J. M. (1991). Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal. *Hereditas*, 114(3), 245–251. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1991.tb00331.x>
205. Vinogradov, A. E., & Chubinishvili, A. T. (1999). Genome Reduction in a Hemiclonal Frog *Rana esculenta* From Radioactively Contaminated Areas. *Genetics*, 151(3), 1123–1125. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.3.1123>
206. Vorburger, C. (2001). Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: Evidence from hybridogenetic frogs. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 55(11), 2319–2332. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00745.x>
207. Wahl, M. (1969). Untersuchungen zur Bio-Akustik des Wasserfrosches *Rana esculenta* (L.). *Oecologia*, 3(1), 14–55. <https://doi.org/10.1007/BF00344632>
208. Waits, L. P., Luikart, G., & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10(1), 249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01185.x>

209. Weber, E. (1976). Alterations in the release calls of six European Anura (Amphibia) after partial or total extirpation of the vocal cords. *Behavioural Processes*, 1(3), 197–216. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(76\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0376-6357(76)90022-X)
210. Yu, Z., Haberer, G., Matthes, M., Rattei, T., Mayer, K. F. X., Gierl, A., & Torres-Ruiz, R. A. (2010). Impact of natural genetic variation on the transcriptome of autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17809–17814. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000852107>
211. Zamfirescu, Ș. (2000). Bioacoustic Aspects of the Release Calls of Some Anuran Species. *Analele Științifice Ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” Din Iași, s. Biologie Animală*, 46, 101–106.
212. Zamfirescu, Ș. (2001). The Bioacoustic Analysis of some Water Frogs' Release Calls (*Rana ridibunda*, *Rana* kl. *esculenta*). *Analele Științifice Ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” Din Iași, s. Biologie Animală*, 47, 109–112.
213. Zamfirescu, Ș. (2002a). Comparison between water frogs (*Rana esculenta* complex) release calls'. *Analele Științifice Ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” Din Iași, s. Biologie Animală*, 48, 182–194.
214. Zamfirescu, Ș. (2002b). Comparison between Water Frogs (*Rana esculenta* Complex) Release Calls. *Analele Științifice Ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” Din Iași, s. Biologie Animală*, 48, 182–194.
215. Zeisset, I., Rowe, G., & Beebee, T. J. C. (2000). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* and *R. lessonae*. *Molecular Ecology*, 9(8), 1173–1174. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00954-2.x>
216. Боброва, А. А., Макарян, Р. М., Шейко, В. П., & Шабанов, Д. А. (2014). Порушення фертильності у міжвидових гібридів зелених жаб із Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex. *Біологія Та Валеологія*, 16, 7–15.
217. Бондарєва, А. А., Сухова, К. В., & Шабанов, Д. А. (2013). Порівняння деяких гематологічних показників диплоїдних та триплоїдних

Pelophylax esculentus. *Праці українського герпетологічного товариства, 2013.*
– № 4. – С. 22-26. <http://dspace.univer.kharkov.ua/handle/123456789/10103>

218. Дрогваленко, Н. А., Макарян, Р. Н., Бірюк, О. В., Коршунов, А. В., & Шабанов, Д. А. (2017). Парадокс воспроизводства триплоидных *Pelophylax esculentus* в гемиклональных популяционных системах зеленых лягушек Брусовки (Донецкая область) и Кременной (Луганская область). / *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, серія “Біологія”*. — Вип. 29. — 2017. — С. 142-150. <http://dspace.univer.kharkov.ua/handle/123456789/14057>

219. Катрушенко, С. (2020). Зовнішньоморфологічні аномалії амфібій Харківської області. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 34*. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2020-34-9>

220. Лада, Г. А. (1998). О необходимости сохранения уникальных «чистых» популяций диплоидной съедобной лягушки (*Rana esculenta* Linnaeus, 1758) в Белгородской и Харьковской областях. *Проблемы Охраны и Рационального Использования Природных Экосистем и Биологических Ресурсов, 333–335*.

221. Макарян, Р. М., Бірюк, О. В., Коршунов, О. В., Кравченко, М. О., Мелешко, О. В., Трохимчук, Р. Р., & Шабанов, Д. А. (2016). Склад пуголовків зеленых жаб (*Pelophylax esculentus* complex) в Іськовому ставі (НПП «Гомільшанські ліси»). 61–65.

222. Манило, В. В., Радченко, В. И., & Коршунов, А. В. (2007). Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl esculenta*) из Харьковской области Украины. <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/16188>

223. Микитинець, Г., & Сурядна, Н. (2007). Розповсюдження та морфологічні особливості зеленых жаб пониззя Дніпра. *Науковий Вісник Ужгородського Університету, 21, 85–91*.

224. Некрасова, О. (2008). Классификация аномалий бесхвостых амфибий. 1, 55–58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4998.8009>

225. Сурядна, Н. (2002). Характеристика морфологической изменчивости озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall., 1771) с территории Крыма. *Вісник Запорізького Державного Університету*, 2, 148–153.

226. Шабанов, Д. А. (2014). Еволюційна екологія популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) Лівобережного лісостепу України: Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 — екологія [Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара]. <http://dspace.univer.kharkov.ua/handle/123456789/11030>

227. Шабанов, Д. А., Коршунов, О. В., & Кравченко, М. О. (2009). Які ж зелені жаби населяють Харківську область? Термінологічний і номенклатурний аспекти проблеми. *Біологія та валеологія*, 11, 164-125.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Список публікацій здобувачки, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.

У виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних *Scopus* та/або *Web of science*:

1. **Fedorova A.**, Pustovalova E., Drohvalenko M. (2023) High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetological Bulletin*. 164, 24-25. <https://doi.org/10.33256/hb164.2425> (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, визначення аномалій, аналіз отриманих даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
2. **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Differences in release calls of the hybrid water frog *Pelophylax esculentus* and its parental species *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) in Ukraine. *Biologia*. 78(3): 1-8. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, запис співів жаб, аналіз аудіозаписів, статистичний аналіз, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
3. Drohvalenko M., **Fedorova A.** (2022) The first evidence of triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone. *Bonn Zoological Bulletin*. 71(2): 105-108. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, аналіз пліодності, підготовка ілюстрацій для статті)
4. Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue of tadpoles' tail tips. *Journal of Vertebrate Biology*, 71(22010): 1-7. (особистий внесок: проведення лабораторних досліджень, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)

У виданнях, які включені до переліку наукових фахових видань України:

4. **Fedorova A.**, Shabanov D. (2022) Genomes diversity in oocytes of hybrid water frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in hemiclinal population systems from Ukraine. *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 24(1): 25-29. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, проведення лабораторних досліджень, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
5. **Fedorova A.**, Pustovalova E. (2021) What the distribution of sperm size can tell about the stability of spermatogenesis in hybrid frogs *Pelophylax esculentus*. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 37(2): 70-78. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, проведення лабораторних досліджень з отримання сперми і вимірювання розмірів клітин, статистичний аналіз, підготовка ілюстрацій для статті, написання та редагування тексту статті)
6. Drohvalenko M., Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. (2021) First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh river basin (Kharkiv region, Ukraine). *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 23 (2): 61-67. (особистий внесок: аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, редагування окремих частин статті)

Наукові публікації, що додатково відображають результати дослідження:

3. Kryvoltsevych A., **Fedorova A.**, Shabanov D., Pustovalova E. (2022) Anomalies in Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) and hybrid waterfrogs (*P. esculentus*) (Anura: Ranidae) from two ponds in the Kharkiv Region of Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 29(1): 204-209. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, аналіз даних, підготовка ілюстрацій для статті, написання окремих частин статті)
4. Drohvalenko M., **Fedorova A.**, Pustovalova E. (2022) Unexpected Heterochrony in the Edible Frog, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus 1758), and

Pallas' Spadefoot, *Pelobates vespertinus* (Pallas 1771), in Eastern Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 29: 472-474. (особистий внесок: участь у зборі матеріалу, підготовка ілюстрацій для статті)

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації

12. Fedorova A. Diversity of frog release calls in the genus *Pelophylax*. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).
13. Drohvalenko, M. O., Fedorova A. O., Pustovalova E. S., Mikulíček P. Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclonal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex. *Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.)* (in print).
14. Shabanov V., Kryvoltsevych A., Zhadan A., Podpryatov O., **Fedorova A.**, Drohvalenko M., Pustovalova E. Monitoring of the state of HPS of water frogs located in Lower Dobrytskyi pond. *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2021, Shatsk, Ukraine)*
15. **Fedorova A.** Repeat study on ploidy of tadpoles from lower Dobrytskyi pond. *SymBioSE-2019 (July 29 – August 6, Glasgow, Scotland)*
16. **Fedorova A.**, Pustovalova E. Results of artificial crossing expand data about reproduction and composition of unusual population system (*Pelophylax esculentus* complex). *Open Readings. 62nd International conference for students of physics and natural sciences. (March 19-22, 2019, Vilnius, Lithuania)*
17. Pustovalova E., **Fedorova A.**, Pereslavska K., Verchoturova P. Hemiclonal population system of water frogs in Lower Dobrytskyi pond: results of annual

- monitoring. *14th International young scientists' conference "Biology: From a Molecule Up to The Biosphere"* (November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine)
18. Drohvalenko M., **Fedorova A.**, Pustovalova E. *Pelophylax esculentus* complex from Iskiv pond: one more step of long-term monitoring. "Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas". *International Zoological Conference. (September 12-15, 2019, Lviv, Shatsk, Ukraine)*
19. **Fedorova A. O.**, Drohvalenko M. O., Pustovalova E. S. Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond. *Abstract book of the Conference of young zoologists (November 14-15, 2018, Kyiv, Ukraine)*
20. Kravchenko M., Pustovalova E., **Fedorova A.**, Shabanov D. Hemiclonal inheritance of water frogs: occasional incident, transition state or the natural stage of development? *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)*
21. Biliaiev I., Bondarenko H., Harbuz D., Drohvalenko M., Siervatovska Y., Sudarenko U., Teplenko U., **Fedorova A.**, Shabanov D. Composition and changes of three hemiclonal population systems of water frogs from NNP "Gomilshanski lisy". *Status and biodiversity of the ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas. (September 13-16, 2018, Shatsk, Ukraine)*
22. Drohvalenko M. O., Kravchenko M. O., Makarian R. M, Stepanyuk Ya. V. **Fedorova A. O.**, Shabanov D.A. Selective genetic and environmental mortality of different representatives of water frogs' hybridogenic complex provides the stability of their hemiclonal population systems. Regional aspects of floristic and faunistic research. *Fifth international scientific and practical conference (April 19-20, 2018, Chernivtsi, Ukraine)*

Додаток 2

Код особини	Таксономічна приналежність	Стать	SVL, мм	Тривалість крику, с	Пікова частота	Діапазон частот	Мінімальна частота	Максимальна частота	Кількість піків	Частота піків
19GR4WF1M	<i>P. epeiroticus</i>	самець	84.95	0.30	925.92	2379.4	430.66	2810.0	63.12	210.17
21GR1-6	<i>P. epeiroticus</i>	самиця	78.29	0.19	1399.6	1765.7	689.06	2454.7	11.25	58.147
19GR6-7	<i>P. epeiroticus</i>	самиця	92.10	0.19	882.86	1722.6	387.59	2110.2	17	87.976
22IT3WF6	<i>P. bergeri</i>	самець	49.56	0.61	1636.5	2088.7	818.26	2906.9	11	17.782
22IT3WF9	<i>P. bergeri</i>	самець	37.76	0.37	1787.2	2863.9	624.46	3488.3	14.25	39.118
22IT3WF8	<i>P. bergeri</i>	самець	39.73	0.24	2433.2	3229.9	1378.1	4608.1	9.5	38.837
22IT3WF2	<i>P. bergeri</i>	самець	53.33	0.25	1378.1	3057.7	516.79	3574.5	8.5	32.878
22IT3WF4M	<i>P. bergeri</i>	самець	55.01	0.40	1765.7	1959.5	861.32	2820.8	16.25	40.123
22IT3-2549	<i>P. bergeri</i>	самиця	43.00	0.31	1744.1	1571.9	839.79	2411.7	21.5	71.979
23IT1WF6F	<i>P. bergeri</i>	самиця	64.91	0.30	925.92	2379.4	430.66	2810.1	63.125	210.1704
23IT1WF2F	<i>P. bergeri</i>	самиця	54.45	0.14	904.39	1830.3	581.39	2411.7	10.5	71.843
23IT1WF4F	<i>P. bergeri</i>	самиця	56.92	0.33	1248.92	1485.7	710.59	2196.3	23.75	70.069
23IT1WF5F	<i>P. bergeri</i>	самиця	60.15	0.23	1162.79	2325.5	516.79	2842.3	17	73.076
22IT3-9467	<i>P. bergeri</i>	самиця	45.73	0.28	1012.06	2067.1	667.52	2734.7	28.5	99.539
21CZ1WF7M	<i>P. esculentus</i>	самець	-	0.33	1248.9	1485.7	710.59	2196.3	23.75	70.069
21SK2WF4M	<i>P. esculentus</i>	самець	-	0.23	1162.7	2325.5	516.79	2842.3	17	73.076
19UKR1WF19M	<i>P. esculentus</i>	самець	85.44	0.35	925.92	1571.9	538.33	2110.2	18.5	52.562

10-2020 AD2M	<i>P. esculentus</i>	самець	60.79	0.17	1464.2	2325.5	904.39	3229.9	15	87.337
10-2020 AD1M	<i>P. esculentus</i>	самець	63.43	0.26	1098.1	1313.5	732.12	2045.6	14.5	54.844
22CZ5WF4F	<i>P. esculentus</i>	самиця	92.82	0.67	882.86	1464.2	366.06	1830.3	36.5	53.430
21CZ2-5	<i>P. esculentus</i>	самиця	100.81	0.46	861.32	1227.3	366.06	1593.4	12.5	26.625
20CZ9-10	<i>P. esculentus</i>	самиця	73.25	0.55	968.99	1528.8	775.19	2304.0	15	26.856
19SK1-2	<i>P. esculentus</i>	самиця	95.64	0.38	1012.0	1550.3	258.39	1808.7	17.5	45.200
-	<i>P. esculentus</i>	самиця	54.03	0.34	1313.5	2347.1	1033.5	3380.7	17	49.208
20CZ9-11	<i>P. esculentus</i>	самиця	88.75	0.57	1076.6	1787.2	430.66	2217.9	15	26.135
22SK1-6F	<i>P. esculentus</i>	самиця	82.85	0.55	1119.7	1248.9	538.33	1787.2	33.25	60.071
22IT2-1	<i>P. hispanicus</i>	самиця	89.68	0.51	1098.1	1873.3	301.46	2174.8	13.25	26.151
22IT2-4F	<i>P. hispanicus</i>	самиця	85.80	0.32	1313.5	2088.7	409.13	2497.8	5.75	17.768
22IT2WF1F	<i>P. hispanicus</i>	самиця	90.78	0.33	990.52	1937.9	602.93	2540.92	43	130.26
21GR1WF5M	<i>P. kurtmuelleri</i>	самець	68.80	0.28	1012.0	2067.1	667.52	2734.7	28.5	99.539
19AL13WF4M	<i>P. kurtmuelleri</i>	самець	81.67	0.32	775.19	1701.1	602.93	2304.0	33.75	103.92
19AL11WF3M	<i>P. kurtmuelleri</i>	самець	79.08	0.45	1119.7	2519.3	624.46	3143.8	54	118.78
21GR1WF3M	<i>P. kurtmuelleri</i>	самець	64.65	0.32	990.52	1937.9	602.92	2540.9	43	130.26
19AL10WF1M	<i>P. kurtmuelleri</i>	самець	99.25	0.45	732.12	1593.4	559.86	2153.3	101.7	217.51
18AL1-11	<i>P. kurtmuelleri</i>	самиця	84.90	0.23	968.99	1614.9	624.46	2239.4	23.75	101.62
19AL10-30	<i>P. kurtmuelleri</i>	самиця	101.6	0.26	1012.0	2239.4	624.46	2863.9	21.5	81.43
19AL13WF7F	<i>P. kurtmuelleri</i>	самиця	91.16	0.26	1098.2	1313.5	732.13	2045.6	14.5	54.84

-	<i>P. lessonae</i>	самець	61.06	0.34	1141.2	1184.3	796.72	1981.0	7.25	21.180
22SK1WF4M	<i>P. lessonae</i>	самець	57.06	1.02	1313.5	1485.7	861.32	2347.1	18	17.210
22SK1WF5M	<i>P. lessonae</i>	самець	52.79	0.68	1335.0	1356.5	947.46	2304.0	20.5	30.111
22SK1WF1M	<i>P. lessonae</i>	самець	57.34	0.94	1593.4	1313.5	753.66	2067.1	12.75	13.469
21CZ2WF2F	<i>P. lessonae</i>	самиця	76.31	0.24	968.99	1722.6	516.79	2239.4	24.75	102.55
22SK1WF3M	<i>P. lessonae</i>	самець	59.17	0.34	1701.1	2002.5	753.66	2756.2	10.25	29.489
kad 2, RR no ID	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.14	904.39	1830.3	581.39	2411.7	10.5	71.843
21CZ4WF19M	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.34	882.86	1593.4	581.39	2174.8	34	99.862
21CZ4WF24M	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.23	1162.7	2153.3	516.79	2670.1	18.75	81.032
21CZ4WF22M	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.21	990.52	1528.8	710.59	2239.4	25.75	121.01
21CZ4WF20M	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.27	775.19	1701.1	581.39	2282.5	29	103.94
21BG1WF2M	<i>P. ridibundus</i>	самець	72.77	0.27	1184.3	1636.5	689.06	2325.5	28	102.26
21CZ4WF18M	<i>P. ridibundus</i>	самець	-	0.34	1076.6	1550.3	689.06	2239.4	24.75	71.478
21BG4WF1M	<i>P. ridibundus</i>	самець	69.61	0.50	904.39	2153.3	559.86	2713.1	19	37.975
22CZ1WF2F	<i>P. ridibundus</i>	самиця	72.91	0.38	1184.3	1614.9	710.59	2325.5	30.75	79.586
21CZ4-10	<i>P. ridibundus</i>	самиця	75.57	0.34	1205.8	1722.6	732.12	2454.7	46.75	133.37
21CZ1-4	<i>P. ridibundus</i>	самиця	78.96	0.43	1162.7	1291.9	818.26	2110.2	56	128.92

Додаток 3

Код особини	Таксономічна приналежність	Стать	Плоідність	SVL, мм	Локалітет	Тривалість крику, с	Пікова частота	Діапазон частот	Мін. частота	Макс. частота	Кількість піків
21D-15	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	59.3	Н. Добрицький став	0.39	1300.7	1013.6	943.35	1957.0	27.5
21D-36	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.30	1107.4	2402.3	714.84	3117.1	25.5
16PR2-9	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	79.1	Сіверський Донець	0.42	1101.5	1300.7	785.15	2085.9	12.25
16PR3-6	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	62	Сіверський Донець	0.46	1171.8	1160.1	691.40	1851.5	17.5
17-D101	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.90	697.26	972.65	609.37	1582.0	39
17-D102	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.39	656.24	1101.5	580.07	1681.6	23.5
17-D103	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.26	662.10	1048.8	556.64	1605.4	32
17-D104	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.57	990.23	1236.3	591.79	1828.1	16.25
17-D105	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.58	697.26	919.92	580.07	1500	46.75
17-D106	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.36	644.53	902.34	568.35	1470.7	26
17-D107	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.54	691.40	1124.9	474.60	1599.6	36
17-D116	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.57	738.28	1189.4	550.78	1740.2	20.25
17-D117	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.52	914.06	931.64	621.09	1552.7	54.25
17-D118	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.34	656.25	1218.7	521.48	1740.2	26
17-D119	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Н. Добрицький став	0.37	656.25	814.45	615.23	1429.6	43.5
17-I07	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	79	Іськів став	0.45	656.25	1007.8	585.93	1593.7	24.75
17-I29	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	73.1	Іськів став	0.28	662.10	855.46	591.79	1447.2	26.25
17-I138	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Іськів став	0.37	703.12	972.65	644.53	1617.1	38
14-D19	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	95.25	Н. Добрицький став	0.32	708.98	832.03	591.79	1423.8	16.75
Kor5	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Коряків став	0.35	958.22	1496.5	785.96	2282.5	28
Kor7	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Коряків став	0.30	1119.7	936.69	732.12	1668.8	26.75
14-P-2Ef	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.41	609.37	902.34	550.78	1453.1	21.75
14-P-3Ef	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.48	890.62	691.40	714.84	1406.2	28.25
14-P-4Ef	<i>P. esculentus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.49	632.81	878.90	550.78	1429.6	22.5
21K-38	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	60.7	Коряків став	0.35	1294.9	796.87	1101.5	1898.4	36
21K-78	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	62.4	Коряків став	0.48	1130.8	1699.2	779.29	2478.5	18.75
21K-79	<i>P. esculentus</i>	самиця	2	47.7	Коряків став	0.51	1470.7	1423.8	1201.1	2624.9	29
21D-01	<i>P. esculentus</i>	самець	2	70.2	Н. Добрицький став	0.35	1828.1	996.09	1201.1	2197.2	28.5

21D-02	<i>P. esculentus</i>	самець	2	68.2	Н. Добрицький став	0.37	1546.8	2103.5	914.06	3017.5	15
21D-03	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66.2	Н. Добрицький став	0.46	1775.3	1658.2	1171.8	2830.0	15.25
21D-04	<i>P. esculentus</i>	самець	2	62.7	Н. Добрицький став	0.37	1060.5	1880.8	761.71	2642.5	22.75
21D-06	<i>P. esculentus</i>	самець	2	68.7	Н. Добрицький став	0.47	1535.1	1623.0	703.12	2326.1	18.75
21D-16	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66.9	Н. Добрицький став	0.50	1816.4	1083.9	1312.4	2396.4	11
21D-18	<i>P. esculentus</i>	самець	2	55.5	Н. Добрицький став	0.50	1623.0	1927.7	1095.7	3023.4	42
21D-20	<i>P. esculentus</i>	самець	2	72.8	Н. Добрицький став	0.42	1019.5	984.37	714.84	1699.2	26.75
21D-21	<i>P. esculentus</i>	самець	2	67.34	Н. Добрицький став	0.31	1535.1	2636.7	1142.5	3779.2	22
21D-22	<i>P. esculentus</i>	самець	2	67	Н. Добрицький став	0.39	1652.3	1417.9	966.79	2384.7	13.25
21D-23	<i>P. esculentus</i>	самець	2	63.85	Н. Добрицький став	0.40	1207.0	1957.0	1060.5	3017.5	24.5
21D-24	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66.9	Н. Добрицький став	0.36	1582.0	1500	1066.4	2566.4	14
21D-26	<i>P. esculentus</i>	самець	2	64.4	Н. Добрицький став	0.43	1365.2	1623.0	1001.9	2625	17
21D-27	<i>P. esculentus</i>	самець	2	62.9	Н. Добрицький став	0.42	1400.3	2437.4	1072.2	3509.7	22
21D-28	<i>P. esculentus</i>	самець	2	65.6	Н. Добрицький став	0.29	1277.3	1828.1	755.85	2583.9	21.25
21D-29	<i>P. esculentus</i>	самець	2	65.1	Н. Добрицький став	0.39	1541.0	1294.9	878.90	2173.8	15
21D-30	<i>P. esculentus</i>	самець	2	65.1	Н. Добрицький став	0.47	1218.7	1253.9	1048.8	2302.7	22.5
21D-31	<i>P. esculentus</i>	самець	2	61.3	Н. Добрицький став	0.39	1599.6	1289.0	1083.9	2373.0	21.25
21D-32	<i>P. esculentus</i>	самець	2	70.5	Н. Добрицький став	0.35	1453.1	2759.7	890.62	3650.3	25
21D-33	<i>P. esculentus</i>	самець	2	69.9	Н. Добрицький став	0.31	1740.2	1675.7	908.20	2583.9	11
21D-34	<i>P. esculentus</i>	самець	2	76.3	Н. Добрицький став	0.37	1195.3	1998.0	732.42	2730.4	21.75
21D-35	<i>P. esculentus</i>	самець	2	69.3	Н. Добрицький став	0.54	1212.8	1189.4	791.01	1980.4	27.5
16PR2-4	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66.7	Сіверський Донець	0.39	1734.3	1664.0	914.06	2578.1	12.5
16PR2-8	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66.1	Сіверський Донець	0.49	2050.7	1441.4	925.78	2367.1	17.25
16PR3-3	<i>P. esculentus</i>	самець	2	68.3	Сіверський Донець	0.47	1828.1	2003.9	820.31	2824.2	13.5
16PR3-7	<i>P. esculentus</i>	самець	2	66	Сіверський Донець	0.43	1851.5	2039.0	867.18	2906.2	15
16PR3-8	<i>P. esculentus</i>	самець	2	63.1	Сіверський Донець	0.31	1195.3	1816.4	902.34	2718.7	8
16PR4-5	<i>P. esculentus</i>	самець	2	71.1	Сіверський Донець	0.41	1804.6	2285.1	1007.8	3292.9	12.75
16PR4-6	<i>P. esculentus</i>	самець	2	74.7	Сіверський Донець	0.31	1570.3	2390.6	1078.1	3468.7	14.5
16PR4-8	<i>P. esculentus</i>	самець	2	69.1	Сіверський Донець	0.41	1734.3	2343.7	1007.8	3351.5	16.5
16PR1-2	<i>P. esculentus</i>	самець	2	70	Сіверський Донець	0.44	1500	1570.3	1007.8	2578.1	17
16PR1-6	<i>P. esculentus</i>	самець	2	67.5	Сіверський Донець	0.41	1500	1558.5	925.78	2484.3	24
16PS1-2	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.36	1593.7	1898.4	714.84	2613.2	13
16PS1-8	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.35	1570.3	2214.8	960.93	3175.7	8.25

16PS2-1	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.29	1570.3	2027.3	902.34	2929.6	8
16PS2-2	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.44	1312.5	1476.5	808.59	2285.1	10.5
16PS2-10	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.42	1417.9	1265.6	679.68	1945.3	19.25
16PS2-11	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.41	1453.1	1957.0	914.06	2871.0	19.75
16PS3-4	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.36	1828.1	2296.8	949.21	3246.0	13.25
16PS3-5	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.23	1148.4	832.03	808.59	1640.6	12
16PS4-7	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.43	1031.2	1335.9	773.43	2109.3	16
16PS4-8	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.40	1898.4	1968.7	843.75	2812.5	24.25
16PS4-11	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.31	1289.0	1476.5	960.93	2437.5	9.75
16PS4-12	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.43	1781.2	1593.7	914.06	2507.8	15
16PS4-13	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.43	1031.2	1664.0	843.75	2507.8	23.75
16PS4-14	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.43	1781.2	1992.1	1007.8	3000	30.5
16PB-6	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.55	1500	1546.8	937.5	2484.3	26.25
16PB-14	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.42	1734.3	1500	984.37	2484.3	21.5
14-D16	<i>P. esculentus</i>	самець	2	76.3	Н. Добрицький став	0.46	779.29	1025.3	609.37	1634.7	17.75
14-D17	<i>P. esculentus</i>	самець	2	73.3	Н. Добрицький став	0.31	808.59	1083.9	603.51	1687.5	10
14-D18	<i>P. esculentus</i>	самець	2	76.45	Н. Добрицький став	0.39	673.82	1546.8	632.81	2179.6	20
14-D21	<i>P. esculentus</i>	самець	2	69.15	Н. Добрицький став	0.39	773.43	1406.2	662.10	2068.3	19.75
14-D23	<i>P. esculentus</i>	самець	2	75.2	Н. Добрицький став	0.37	1306.6	1160.1	720.70	1880.8	18.25
14-D24	<i>P. esculentus</i>	самець	2	71.7	Н. Добрицький став	0.64	1294.9	1447.2	703.12	2150.3	23
14-D36	<i>P. esculentus</i>	самець	2	71.5	Н. Добрицький став	0.39	714.84	855.46	609.37	1464.8	25.75
14-I01	<i>P. esculentus</i>	самець	2	72	Іськів став	0.50	914.06	2185.5	656.25	2841.7	20.5
14-II2	<i>P. esculentus</i>	самець	2	61.4	Іськів став	0.39	861.32	608.31	680.98	1289.3	24.75
Kor10	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.37	1927.2	1668.8	818.26	2487.0	16
Kor11	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.42	1733.4	1550.3	785.96	2336.3	16
Kor12	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.46	947.46	1679.5	796.72	2476.3	20.5
Kor13	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.46	1345.8	1496.5	732.12	2228.6	23.5
Kor14	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.41	1356.5	1281.2	753.66	2034.8	19.5
Kor15	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.40	1421.1	1571.9	689.06	2260.9	14
Kor16	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.56	861.32	1625.7	742.89	2368.6	14.25
Kor17	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.37	2024.1	1518.0	721.36	2239.4	13.5
Kor19	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.44	861.32	1108.9	753.66	1862.6	13.75
Kor22	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.42	936.69	1754.9	753.66	2508.6	12.5

Kor23	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.46	1119.7	1744.1	775.19	2519.3	17.75
Kor26	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.48	1130.4	1496.5	850.56	2347.1	20
Kor26	<i>P. esculentus</i>	самець	2		Коряків став	0.40	1108.9	1550.3	829.02	2379.4	14
21K-39	<i>P. esculentus</i>	самець	2	53.2	Коряків став	0.53	1365.2	873.04	1136.7	2009.7	24
21K-40	<i>P. esculentus</i>	самець	2	55.1	Коряків став	0.53	1335.9	978.51	1166.0	2144.5	23.5
21K-41	<i>P. esculentus</i>	самець	2	72.7	Коряків став	0.50	1242.1	1119.1	843.75	1962.8	25.75
21K-44	<i>P. esculentus</i>	самець	2	55.4	Коряків став	0.38	1388.6	2296.8	919.92	3216.7	22.75
21D-37	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	57.6	Н. Добрицький став	0.28	1230.4	1218.7	1095.7	2314.4	41.25
21D-07	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	65.7	Н. Добрицький став	0.26	996.09	1833.9	691.40	2525.3	44.25
21D-08	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	65.6	Н. Добрицький став	0.30	1078.1	1582.0	714.84	2296.8	59.5
21D-09	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	72.2	Н. Добрицький став	0.44	1113.2	1171.8	914.06	2085.9	52.75
21D-10	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	76.1	Н. Добрицький став	0.34	1160.1	1669.9	738.28	2408.2	55
21D-11	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	70.7	Н. Добрицький став	0.52	1300.7	1113.2	878.90	1992.1	107
21D-12	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	72.8	Н. Добрицький став	0.43	1113.2	1312.4	855.46	2167.9	80.25
21D-13	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	76.5	Н. Добрицький став	0.51	826.17	1160.1	667.96	1828.1	58
21D-14	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	80.8	Н. Добрицький став	0.46	837.89	1166.0	708.98	1874.9	75
21D-17	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	63.5	Н. Добрицький став	0.36	1728.5	3708.9	1195.3	4904.2	62.5
21D-39	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	68.4	Н. Добрицький став	0.55	1107.4	1330.0	767.57	2097.6	78.25
21D-40	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	66.9	Н. Добрицький став	0.34	1224.6	1623.0	1001.9	2625	33
21D-42	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	74.7	Н. Добрицький став	0.57	1201.1	1886.7	779.29	2666.0	95.25
16PR3-1	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	62.2	Сіверський Донець	0.24	1207.0	1019.5	902.34	1921.8	19.25
16PR4-1	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	62.6	Сіверський Донець	0.18	1089.8	667.96	914.06	1582.0	24.75
16PR1-1	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	73.3	Сіверський Донець	0.27	1171.8	937.5	843.75	1781.2	35.75
16PR1-3	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	82	Сіверський Донець	0.36	832.03	1066.4	656.25	1722.6	38
16PR1-8	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	71.1	Сіверський Донець	0.25	972.65	984.37	761.71	1746.0	39.5
16PR1-9	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	61.5	Сіверський Донець	0.39	1371.0	1441.4	996.09	2437.5	62.5
16PR1-10	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	58.2	Сіверський Донець	0.42	1593.7	1042.9	1054.6	2097.6	60.75
16PB-3	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.24	1218.7	1031.2	937.5	1968.7	45.25
16PB-4	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.39	1593.7	1171.8	1078.1	2250	65
16PB-5	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.36	1500	1406.2	1007.8	2414.0	73.75
16PB-8	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.24	1617.1	937.5	1101.5	2039.0	46.5
16PB-11	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.41	843.75	726.56	703.12	1429.6	65.25
16PB-16	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.56	1148.4	1617.1	796.87	2414.0	91.25

14-D20	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2	86.2	Н. Добрицький став	0.44	703.12	708.98	568.35	1277.3	43.5
14-P-4Rf	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.30	1277.3	878.90	691.40	1570.3	40.75
14-P-9Rf	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.41	714.84	562.5	562.5	1125	45.25
14-P-11R	<i>P. ridibubdus</i>	самиця	2		Сіверський Донець	0.32	691.40	738.28	562.5	1300.7	43
16PR2-1	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	65.2	Сіверський Донець	0.44	1218.7	820.31	914.06	1734.3	45
16PR2-2	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	73.5	Сіверський Донець	0.36	984.37	1335.9	796.87	2132.8	31
16PR2-3	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	71.4	Сіверський Донець	0.40	960.93	1382.8	656.25	2039.0	26
16PR2-7	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	71.1	Сіверський Донець	0.30	1218.7	820.31	773.43	1593.7	27
16PR3-5	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	65.6	Сіверський Донець	0.31	1523.4	1722.6	843.75	2566.4	32.5
16PR1-4	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	66.7	Сіверський Донець	0.35	1113.2	1839.8	726.56	2566.4	19.25
16PR1-5	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	80.1	Сіверський Донець	0.24	937.5	1734.3	796.87	2531.2	30.25
16PR1-7	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2	77.2	Сіверський Донець	0.22	996.09	1488.2	726.56	2214.8	15.75
16PS1-1	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.36	1406.2	2062.5	902.34	2964.8	30.5
16PS1-3	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.27	1160.1	2074.2	925.78	3000	22
16PS1-5	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.26	925.78	1851.5	820.31	2671.8	21.75
16PS1-6	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.46	1558.5	1406.2	914.06	2320.3	16
16PS1-7	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.35	1910.1	1710.9	1054.6	2765.6	17.25
16PS1-10	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.29	1347.6	1980.4	738.28	2718.7	27.25
16PS2-3	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.34	1300.7	1500	796.87	2296.8	11
16PS2-4	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.48	1019.5	1406.2	656.25	2062.5	23.75
16PS2-5	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.25	914.06	1300.7	691.40	1992.1	29
16PS2-6	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.29	1500	2074.2	750	2824.2	20.25
16PS2-7	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.51	972.65	1453.1	714.84	2167.9	27.75
16PS2-8	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.35	1183.5	1792.9	750	2542.9	39.25
16PS2-9	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.34	1089.8	1664.0	785.15	2449.2	38.25
16PS3-1	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.42	1089.8	1863.2	808.59	2671.8	11.25
16PS3-2	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.40	984.37	1300.7	703.12	2003.9	21.5
16PS3-3	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.38	644.53	1335.9	609.37	1945.3	24.25
16PS3-6	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.42	1007.8	1605.4	820.31	2425.7	30.75
16PS3-7	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.35	1007.8	1804.6	667.96	2472.6	30
16PS3-8	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.37	1160.1	1898.4	574.21	2472.6	27.25
16PS3-9	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.40	1101.5	1757.8	644.53	2402.3	18.5
16PS4-1	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.34	1476.5	773.43	1007.8	1781.2	24.25

16PS4-2	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.32	1335.9	2765.6	843.75	3609.3	46
16PS4-3	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.31	1054.6	1242.1	773.43	2015.6	25.25
16PS4-4	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.38	1054.6	1382.8	796.87	2179.6	57.75
16PS4-5	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.26	1101.5	1757.8	703.12	2460.9	26.5
16PS4-6	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.40	914.06	1546.8	585.93	2132.8	42.5
16PS4-9	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.20	1031.2	1453.1	843.75	2296.8	25
16PS4-10	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.35	890.62	1031.2	750	1781.2	43.75
16PB-1	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.50	1359.3	1148.4	937.5	2085.9	49
16PB-12	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.21	1570.3	1335.9	796.87	2132.8	20
14-P-1Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.40	1335.9	960.93	984.37	1945.3	29.75
14-P-3Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.23	1441.4	890.62	1089.8	1980.4	52.25
14-P-5Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.25	1371.0	1335.9	808.59	2144.5	49.75
14-P-6Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.25	1230.4	1078.1	808.59	1886.7	27
14-P-7Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.27	1359.3	1125	726.56	1851.5	21.25
14-P-8Rm	<i>P. ridibubdus</i>	самець	2		Сіверський Донець	0.41	1851.5	1253.9	1054.6	2308.5	61.25
21K-51	<i>P. esculentus</i>	самець	3	64	Коряків став	0.63	1212.8	814.45	744.14	1558.5	23
21K-120	<i>P. esculentus</i>	самець	3	53	Коряків став	0.39	1359.3	1828.1	972.65	2800.7	13.25
21K-121	<i>P. esculentus</i>	самець	3	50.5	Коряків став	0.38	1248.0	1927.7	1019.5	2947.2	29.5
21D-19	<i>P. esculentus</i>	самець	3	64.7	Н. Добрицький став	0.29	1248.0	1617.1	849.60	2466.7	21.5
21D-25	<i>P. esculentus</i>	самець	3	70	Н. Добрицький став	0.33	1341.7	1611.3	785.15	2396.4	14.75
21K-68	<i>P. esculentus</i>	самиця	3	48.7	Коряків став	0.22	1423.8	2660.1	1054.6	3714.8	8.75
21K-114	<i>P. esculentus</i>	самиця	3	54.3	Коряків став	0.48	1488.2	2402.3	1125	3527.3	42.75
21D-38	<i>P. esculentus</i>	самиця	3	52.5	Н. Добрицький став	0.30	1476.5	1394.5	1136.7	2531.2	35

Додаток 4

Код особини	Таксономічна приналежність	Плоїдність	Локалітет	SVL	Площа еритроцита, мкм ²	Площа ядра, мкм ²	Ядерно-клітинне співвідношення
21I-05	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	61.8	235.80	28.60	0.12
21I-14	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	89.6	344.85	49.07	0.14
20I-25	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	55.3	248.84	29.12	0.12
20I-48	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	54.1	301.82	39.16	0.13
20I-52	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	65.4	338.31	43.38	0.13
20I-50	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	68.2	311.50	45.05	0.14
20I-53	<i>P. esculentus</i>	3	Іськів став	60.7	319.52	47.92	0.15
23D02	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	73.58	305.83	41.65	0.14
23D17	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	66.70	383.03	55.75	0.15
23D26	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	73.93	368.45	71.28	0.19
23D28	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	98.02	399.83	54.61	0.14
23D40	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	100.35	329.51	54.40	0.17
23D41	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	94.14	384.75	51.07	0.13
23D59	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	74.73	410.30	60.97	0.15
23D61	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	92.65	379.90	63.17	0.17
23D65	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	68.92	375.56	43.19	0.12
23D79	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	60.85	461.45	63.31	0.14
23D89	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	66.41	325.47	51.82	0.16
23D110	<i>P. esculentus</i>	3	Нижній Добрицький став	56.91	310.65	42.50	0.14
20I-38	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	57.9	229.66	30.37	0.13

20I-47	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	56.2	247.74	28.85	0.12
20I-45	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	61.8	224.65	30.00	0.13
20I-56	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	62.3	210.19	29.84	0.14
20I-57	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	68.7	272.65	30.43	0.11
20I-37	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	53.7	250.01	33.36	0.13
20I-14	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	60.8	256.02	33.60	0.13
20I-15	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	57.5	237.39	34.10	0.14
20I-16	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	67	259.51	34.84	0.13
20I-13	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	59.3	230.33	36.37	0.16
20I-55	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	59	237.30	35.03	0.15
21I-03	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	73.5	235.41	33.80	0.14
21I-04	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	54.2	221.23	30.86	0.14
21I-13	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	75.1	274.49	34.16	0.12
21I-08	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	75.3	252.77	33.16	0.13
21I-07	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	71.7	271.40	33.35	0.12
21I-06	<i>P. esculentus</i>	2	Іськів став	61.5	234.33	27.32	0.12
23D01	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	79.86	273.29	41.98	0.15
23D25	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	72.10	253.12	39.35	0.16
23D27	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	78.01	288.36	41.20	0.14
23D39	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	74.59	265.99	41.82	0.16
23D42	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	74.94	265.85	41.50	0.16
23D60	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	59.39	227.07	38.48	0.17
23D62	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	71.04	325.01	40.48	0.12
23D66	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	73.44	362.46	56.68	0.16
23D80	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	70.82	293.25	54.72	0.19
23D90	<i>P. esculentus</i>	2	Нижній Добрицький став	69.52	283.42	44.21	0.16
20I-54	<i>P. ridibundus</i>	2	Іськів став	60.9	212.08	29.46	0.14

23D104	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	54.33	219.83	42.81	0.19
23D109	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	40.24	190.90	34.40	0.18
23D-107	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	49.44	227.61	47.18	0.21
23D-108	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	80.26	254.72	47.49	0.19
23D-100	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	82.21	268.92	47.51	0.18
23D-97	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	85.92	244.09	31.72	0.13
23D-88	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	61.34	281.76	50.66	0.18
23D-83	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	53.53	243.02	36.00	0.15
23D-52	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	70.40	298.44	46.87	0.16
23D-35	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	57.21	245.46	50.66	0.21
23D-14	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	74.97	230.12	51.46	0.22
23D-16	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	90.81	220.44	40.05	0.18
23D-19	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	74.67	255.17	38.71	0.15
23D-03	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	75.00	288.68	48.69	0.17
23D-34	<i>P. ridibundus</i>	2	Нижній Добрицький став	46.21	249.99	32.06	0.13

Додаток 5

Мультиплекс	Локус	Алелі		Посилання
		L-специфічні	R-специфічні	
1	GA1A19	98	98, 102, 104, 108, 126	Arioli et al. 2010 Pruvost et al. 2013
	RICA2a34	142	-	Christiansen and Reyer 2009
	RICA18	184, 186, 188, 190	-	Garner et al. 2000
	RICA1b5	119	131, 133	Garner et al. 2000
2	RICA1b20	81, 83, 89, 91, 100, 123, 125, 127, 131, 133	81, 83, 89, 91, 100, 123, 125, 127, 131, 133	Garner et al. 2000
	Rrid059A	100	123, 125, 127, 131, 133	Hotz et al. 2001; Christiansen and Reyer 2009
	Re1Caga10	83, 96	-	Arioli et al. 2010
	Re2Caga3	-	173, 220, 225, 230, 233, 238, 240, 242, 247, 251, 254, 256, 258, 266, 270, 274	Arioli et al. 2010
3	RICA5	260, 263	-	Garner et al. 2000
	Rrid082A	-	162, 168, 181, 191, 197	Hotz et al. 2001
	Res17	-	159, 171, 173	Zeisset et al. 2000
	Res22	-	84, 86, 88, 104, 112	Zeisset et al. 2000
4	RICA1a27	104	-	Christiansen and Reyer 2009
	Ga1a23	107, 112	-	Christiansen and Reyer 2009
	Rrid064A	-	209, 224, 226	Christiansen and Reyer 2009
	Rrid135A	-	171, 173, 179, 193, 195, 206, 209	Christiansen and Reyer 2009
	Rrid171A	-	156, 160, 175, 178, 183	Hotz et al. 2001

Додаток 6. Д – дорослий, П – пуголовок. М – самець, F – самиця

Код	Вік	Стать	Геном	SVL, мм	GA1A19	GA1A19	GA1A19	RICA18	RICA18	RICA2a34	RICA2a34	RICA1b5	RICA1b5	RelCaga10	RelCaga10
20I-01	Д	М	LR	69.8	98	102		190	190	142	142	119	131	96	96
20I-02	Д	М	LR	50.7	98	98		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-03	Д	М	LR	71.2	98	102		186	186	142	142	119	133	83	83
20I-04	Д	М	LR	52.7	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-05	Д	М	LR	72.9	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-06	Д	М	LR	52.7	98	98		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-07	Д	М	LR	66.2	98	108		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-08	Д	М	LR	71.3	98	98		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-09	Д	М	LR	73.9	98	108		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-10	Д	М	LR	59.2	98	98		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-11	Д	М	LR	69.5	98	98		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-12	Д	М	LR	72.4	98	104		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-13	Д	М	LR	59.3	98	108		188	188	142	142	119	133	96	96
20I-14	Д	М	LR	60.8	98	98		190	190	142	142	119	133	96	96
20I-15	Д	М	LR	57.5	98	102		186	186	142	142	119	131	83	83
20I-16	Д	F	LR	67	98	98		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-18	Д	М	LR	62.5	98	98		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-19	Д	М	LR	74.4	98	102		186	186	142	142	119	131	83	83
20I-20	Д	М	LR	60.3	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-21	Д	М	LR	62.5	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-22	Д	М	LR	57.4	98	102		186	186	142	142	119	133	96	112
20I-23	Д	М	LR	58	98	102		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-24	Д	М	LR	54.5	98	102		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-25	Д	F	LRR	55.3	98	102		186	186	142	142	119	133	83	83
20I-27	Д	М	LR	57.5	98	102		190	190	142	142	119	131	96	96
20I-28	Д	М	LR	60.7	98	98		190	190	142	142	119	133	96	96
20I-29	Д	М	LR	61.4	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-31	Д	М	LR	53.1	98	102		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-32	Д	М	LR	69.5	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-33	Д	М	LR	59.7	98	102		186	186	142	142	119	131	83	83
20I-34	Д	М	LR	60.9	98	98		186	186	142	142	119	131	96	96
20I-35	Д	М	LR	65.5	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-37	Д	М	LR	53.7	98	102		190	190	142	142	119	131	96	96
20I-38	Д	М	LR	57.9	98	102		186	186	142	142	119	133	83	83
20I-39	Д	М	LR	76.3	98	98		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-40	Д	М	LR	62.2	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-41	Д	М	LR	60.5	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-42	Д	М	LR	60.4	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-43	Д	М	LR	53.8	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-44	Д	М	LR	59.6	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-45	Д	М	LR	61.8	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96

20I-47	Д	M	LR	56.2	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-48	Д	F	LRR	54.1	98	102	108	186	186	142	142	119	133	96	96
20I-50	Д	F	LRR	68.2	98	102		184	184	142	142	119	131	96	96
20I-52	Д	F	LRR	65.4	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-53	Д	M	LRR	60.7	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-54	Д	F	RR	60.9	98	126		0	0	0	0	133	133	0	0
20I-55	Д	F	LR	59	98	108		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-56	Д	M	LR	62.3	98	102		186	186	142	142	119	133	96	96
20I-57	Д	M	LR	68.7	98	108		186	186	142	142	119	133	96	96
678	П	F	RR		98	102		0	0	0	0	133	133	83	83
679	П	M	LR		98	98		184	184	142	142	0	0	96	96
680	П	M	LR		98	102		184	184	142	142	119	133	96	96
681	П	M	LR		98	102		184	184	142	142	119	131	96	96
686	П	M	LR		98	98		184	184	142	142	119	133	96	96

Код	Вік	Стать	Геном	SVL, мм	RICA1b20	RICA1b20	RICA1b20	Re2Caga3	Re2Caga3	RICA5	RICA5	Rrid082A	Rrid082A	Res17	Res17
20I-01	Д	M	LR	69.8	89	91		242	242	263	263	181	181	171	171
20I-02	Д	M	LR	50.7	89	91		254	254	263	263	162	162	159	159
20I-03	Д	M	LR	71.2	81	89		233	233	260	260	162	162	173	173
20I-04	Д	M	LR	52.7	89	91		254	254	260	260	191	191	159	159
20I-05	Д	M	LR	72.9	89	91		270	270	260	260	162	162	171	171
20I-06	Д	M	LR	52.7	89	91		220	220	263	263	162	162	159	159
20I-07	Д	M	LR	66.2	89	91		220	220	260	260	162	162	159	159
20I-08	Д	M	LR	71.3	89	89		242	242	260	260	162	162	171	171
20I-09	Д	M	LR	73.9	89	91		242	242	260	260	162	162	159	159
20I-10	Д	M	LR	59.2	83	89		258	258	263	263	162	162	159	159
20I-11	Д	M	LR	69.5	89	91		220	220	260	260	197	197	171	171
20I-12	Д	M	LR	72.4	89	89		230	230	260	260	181	181	171	171
20I-13	Д	M	LR	59.3	83	89		225	225	263	263	162	162	171	171
20I-14	Д	M	LR	60.8	89	91		247	247	263	263	162	162	159	159
20I-15	Д	M	LR	57.5	89	91		230	230	263	263	162	162	171	171
20I-16	Д	F	LR	67	89	91		240	240	263	263	162	162	171	171
20I-18	Д	M	LR	62.5	89	91		233	233	263	263	162	162	171	171
20I-19	Д	M	LR	74.4	89	91		254	254	263	263	162	162	171	171
20I-20	Д	M	LR	60.3	89	91		238	238	263	263	168	168	159	159
20I-21	Д	M	LR	62.5	89	91		242	242	260	260	191	191	159	159
20I-22	Д	M	LR	57.4	83	89		173	173	260	260	162	162	159	159
20I-23	Д	M	LR	58	89	91		233	233	263	263	162	162	159	159
20I-24	Д	M	LR	54.5	83	89		242	242	260	260	162	162	171	171
20I-25	Д	F	LRR	55.3	83	89		247	274	263	263	162	162	0	0
20I-27	Д	M	LR	57.5	83	89		220	220	263	263	162	162	159	159
20I-28	Д	M	LR	60.7	89	91		230	230	263	263	168	168	171	171
20I-29	Д	M	LR	61.4	89	91		254	254	263	263	162	162	159	159

20I-31	Д	M	LR	53.1	89	91		225	225	263	263	162	162	0	0
20I-32	Д	M	LR	69.5	89	91		254	254	263	263	162	162	171	171
20I-33	Д	M	LR	59.7	89	89		238	238	263	263	162	162	0	0
20I-34	Д	M	LR	60.9	83	89		258	258	263	263	162	162	171	171
20I-35	Д	M	LR	65.5	89	91		220	220	263	263	162	162	171	171
20I-37	Д	M	LR	53.7	83	89		258	258	263	263	162	162	159	159
20I-38	Д	M	LR	57.9	83	89		258	258	263	263	162	162	0	0
20I-39	Д	M	LR	76.3	83	89		230	230	263	263	162	162	0	0
20I-40	Д	M	LR	62.2	89	91		233	233	263	263	162	162	171	171
20I-41	Д	M	LR	60.5	89	91		258	258	260	260	162	162	159	159
20I-42	Д	M	LR	60.4	89	91		254	254	260	260	162	162	159	159
20I-43	Д	M	LR	53.8	89	91		225	225	263	263	162	162	159	159
20I-44	Д	M	LR	59.6	89	91		247	247	260	260	181	181	159	159
20I-45	Д	M	LR	61.8	89	91		266	266	263	263	162	162	0	0
20I-47	Д	M	LR	56.2	89	91		266	266	260	260	162	162	0	0
20I-48	Д	F	LRR	54.1	83	89		238	242	263	263	162	162	171	171
20I-50	Д	F	LRR	68.2	83	89	91	230	233	263	263	162	162	159	171
20I-52	Д	F	LRR	65.4	89	91		238	254	263	263	162	162	171	171
20I-53	Д	M	LRR	60.7	89	91		251	256	263	263	162	162	159	159
20I-54	Д	F	RR	60.9	91	91		238	254	0	0	162	162	159	159
20I-55	Д	F	LR	59	89	91		258	258	263	263	162	162	171	171
20I-56	Д	M	LR	62.3	89	91		254	254	263	263	162	162	0	0
20I-57	Д	M	LR	68.7	83	89		220	220	260	260	162	162	159	159
678	П	F	RR		91	91		233	254	0	0	162	162	159	159
679	П	M	LR		89	91		258	258	263	263	162	162	159	159
680	П	M	LR		89	91		258	258	263	263	162	162	159	159
681	П	M	LR		89	91		254	254	263	263	162	162	159	159
686	П	M	LR		89	91		254	254	263	263	162	162	159	159

Код	Вік	Стать	Геном	SVL, мм	CA1a27	CA1a27	Rrid171A	Rrid171A	Ga1a23	Ga1a23	Rrid064A	Rrid064A	Rrid135A	Rrid135A	Res22	Res22
20I-01	Д	M	LR	69.8	104	104	156	156	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-02	Д	M	LR	50.7	104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-03	Д	M	LR	71.2	104	104	175	175	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-04	Д	M	LR	52.7	104	104	183	183	112	112	226	226	195	195	84	84
20I-05	Д	M	LR	72.9	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
20I-06	Д	M	LR	52.7	104	104	160	160	112	112	226	226	171	171	112	112
20I-07	Д	M	LR	66.2	104	104	183	183	112	112	209	209	171	171	84	84
20I-08	Д	M	LR	71.3	104	104	175	175	112	112	0	0	171	171	86	86
20I-09	Д	M	LR	73.9	104	104	183	183	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-10	Д	M	LR	59.2	104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-11	Д	M	LR	69.5	104	104	175	175	112	112	0	0	171	171	84	84
20I-12	Д	M	LR	72.4	104	104	175	175	112	112	0	0	193	193	86	86
20I-13	Д	M	LR	59.3	104	104	0	0	112	112	224	224	171	171	86	86

20I-14	Д	M	LR	60.8	104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-15	Д	M	LR	57.5	104	104	156	156	112	112	0	0	206	206	86	86
20I-16	Д	F	LR	67	104	104	156	156	112	112	0	0	195	195	104	104
20I-18	Д	M	LR	62.5	104	104	183	183	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-19	Д	M	LR	74.4	104	104	156	156	112	112	226	226	206	206	86	86
20I-20	Д	M	LR	60.3	104	104	175	175	112	112	224	224	206	206	86	86
20I-21	Д	M	LR	62.5	104	104	183	183	112	112	226	226	209	209	84	84
20I-22	Д	M	LR	57.4	104	104	178	183	112	112	0	0	195	195	86	86
20I-23	Д	M	LR	58	104	104	160	160	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-24	Д	M	LR	54.5	104	104	156	156	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-25	Д	F	LRR	55.3	104	104	156	156	112	112	224	224	171	195	86	86
20I-27	Д	M	LR	57.5	104	104	156	156	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-28	Д	M	LR	60.7	104	104	156	156	112	112	226	226	171	171	86	86
20I-29	Д	M	LR	61.4	104	104	156	178	112	112	224	224	206	206	86	86
20I-31	Д	M	LR	53.1	104	104	156	156	112	112	226	226	193	193	86	86
20I-32	Д	M	LR	69.5	104	104	175	175	112	112	209	209	171	171	86	86
20I-33	Д	M	LR	59.7	104	104	156	156	112	112	226	226	171	171	86	86
20I-34	Д	M	LR	60.9	104	104	156	156	112	112	226	226	171	171	86	86
20I-35	Д	M	LR	65.5	104	104	175	175	112	112	0	0	195	195	86	86
20I-37	Д	M	LR	53.7	104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-38	Д	M	LR	57.9	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
20I-39	Д	M	LR	76.3	104	104	175	175	112	112	0	0	171	171	86	86
20I-40	Д	M	LR	62.2	104	104	160	160	112	112	226	226	171	171	86	86
20I-41	Д	M	LR	60.5	104	104	178	178	112	112	0	0	195	195	86	86
20I-42	Д	M	LR	60.4	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
20I-43	Д	M	LR	53.8	104	104	183	183	112	112	226	226	171	171	86	86
20I-44	Д	M	LR	59.6	104	104	183	183	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-45	Д	M	LR	61.8	104	104	175	175	112	112	226	226	206	206	86	86
20I-47	Д	M	LR	56.2	104	104	175	175	112	112	0	0	179	179	86	86
20I-48	Д	F	LRR	54.1	104	104	156	156	112	112	209	209	173	193	86	88
20I-50	Д	F	LRR	68.2	104	104	156	156	112	112	224	226	171	171	86	86
20I-52	Д	F	LRR	65.4	104	104	175	175	112	112	224	224	171	171	86	86
20I-53	Д	M	LRR	60.7	104	104	156	156	107	107	226	226	171	173	86	86
20I-54	Д	F	RR	60.9	0	0	156	156	0	0	224	224	171	171	86	86
20I-55	Д	F	LR	59	104	104	178	178	112	112	224	224	195	195	86	86
20I-56	Д	M	LR	62.3	104	104	178	178	112	112	209	209	195	195	86	86
20I-57	Д	M	LR	68.7	104	104	156	156	112	112	209	209	171	171	86	86
678	П	F	RR		0	0	156	178	0	0	224	224	171	171	86	86
679	П	M	LR		104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
680	П	M	LR		104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
681	П	M	LR		104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
686	П	M	LR		104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86

Додаток 7.

L, R1, R2 – справжні геноми; R_Var – штучно сконструйовані комбінації

Код	Геном	Мультилокусний генотип (МЛГ)	№ клональної лінії
686	L	98981841841421421191199696263263104104112112g	1
681	L	98981841841421421191199696263263104104112112g	1
680	L	98981841841421421191199696263263104104112112g	1
20I-50	L	98981841841421421191199696263263104104112112g	1
20I-38	L	98981861861421421191198383263263104104112112g	2
20I-33	L	98981861861421421191198383263263104104112112g	2
20I-25	L	98981861861421421191198383263263104104112112g	2
20I-19	L	98981861861421421191198383263263104104112112g	2
20I-15	L	98981861861421421191198383263263104104112112g	2
20I-57	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-47	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-44	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-42	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-41	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-24	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-22	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-21	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-12	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-11	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-09	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-08	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-07	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-05	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-04	L	98981861861421421191199696260260104104112112g	3
20I-38	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-56	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-55	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-52	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-48	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-45	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-43	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-40	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-39	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-35	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-34	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-32	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-31	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-29	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-23	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-20	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-18	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-16	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-10	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-06	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4

20I-02	L	98981861861421421191199696263263104104112112g	4
20I-37	L	98981901901421421191199696263263104104112112g	5
20I-28	L	98981901901421421191199696263263104104112112g	5
20I-27	L	98981901901421421191199696263263104104112112g	5
20I-14	L	98981901901421421191199696263263104104112112g	5
20I-01	L	98981901901421421191199696263263104104112112g	5
679	L	9898184184142142009696263263104104112112g	6
20I-03	L	98981861861421421191198383260260104104112112g	7
20I-53	L	98981861861421421191199696263263104104107107g	8
20I-13	L	98981881881421421191199696263263104104112112g	9

Код	Геном	Мультилокусний генотип (МЛГ)	№ клональної лінії
686	R1	98981331332542541621621591591561562242241711718686g	1
20I-02	R1	98981331332542541621621591591561562242241711718686g	1
20I-54	R_Var3	98981331332542541621621591591561562242241711718686g	1
20I-01	R1	1021021311312422421811811711711561562092091711718686g	2
20I-03	R1	1021021331332332331621621731731751752092091711718686g	3
20I-04	R1	1021021331332542541911911591591831832262261951958484g	4
20I-05	R1	102102133133270270162162171171156156001711718686g	5
20I-06	R1	9898131131220220162162159159160160226226171171112112g	6
20I-07	R1	1081081331332202201621621591591831832092091711718484g	7
20I-08	R1	9898133133242242162162171171175175001711718686g	8
20I-09	R1	1081081331332422421621621591591831832092091711718686g	9
20I-10	R1	98981311312582581621621591591561562242241711718686g	10
20I-11	R1	9898133133220220197197171171175175001711718484g	11
20I-12	R1	104104131131230230181181171171175175001931938686g	12
20I-13	R1	1081081331332252251621621711711002242241711718686g	13
20I-14	R1	98981331332472471621621591591561562242241711718686g	14
20I-15	R1	102102131131230230162162171171156156002062068686g	15
20I-16	R1	989813113124024016216217117115615600195195104104g	16
20I-18	R1	98981331332332331621621711711831832092091711718686g	17
20I-19	R1	1021021311312542541621621711711561562262262062068686g	18
20I-20	R1	1021021331332382381681681591591751752242242062068686g	19
20I-21	R1	1021021331332422421911911591591831832262262092098484g	20
20I-22	R1	102102133133173173162162159159178183001951958686g	21
20I-23	R1	1021021311312332331621621591591601602092091711718686g	22
20I-24	R1	1021021311312422421621621711711561562092091711718686g	23
20I-25	R1	102102133133247247162162001561562242241711718686g	24
20I-25	R1	102102133133247247162162001561562242241951958686g	25
20I-25	R1	102102133133274274162162001561562242241711718686g	26
20I-25	R1	102102133133274274162162001561562242241951958686g	27
20I-27	R1	1021021311312202201621621591591561562092091711718686g	28
20I-28	R1	98981331332302301681681711711561562262261711718686g	29
20I-29	R1	1021021331332542541621621591591561782242242062068686g	30
20I-31	R1	102102131131225225162162001561562262261931938686g	31
20I-32	R1	1021021331332542541621621711711751752092091711718686g	32
20I-33	R1	102102131131238238162162001561562262261711718686g	33

20I-34	R1	98981311312582581621621711711561562262261711718686g	34
20I-35	R1	102102133133220220162162171171175175001951958686g	35
20I-37	R1	1021021311312582581621621591591561562242241711718686g	36
20I-38	R1	10210213313325825816216200156156001711718686g	37
20I-39	R1	989813313323023016216200175175001711718686g	38
20I-40	R1	1021021331332332331621621711711601602262261711718686g	39
20I-41	R1	102102133133258258162162159159178178001951958686g	40
20I-42	R1	102102133133254254162162159159156156001711718686g	41
20I-43	R1	1021021331332252251621621591591831832262261711718686g	42
20I-44	R1	1021021331332472471811811591591831832242241711718686g	43
20I-45	R1	102102133133266266162162001751752262262062068686g	44
20I-47	R1	10210213313326626616216200175175001791798686g	45
20I-48	R1	1021081331332382381621621711711561562092091731938688g	46
20I-48	R2	1021081331332422421621621711711561562092091731938688g	47
20I-50	R_Var1	1021021311312302301621621591591561562262261711718686g	48
20I-50	R_Var2	1021021311312302301621621711711561562262261711718686g	49
20I-50	R_Var3	1021021311312332331621621591591561562242241711718686g	50
20I-50	R_Var4	1021021311312332331621621711711561562242241711718686g	51
20I-50	R_Var5	1021021311312332331621621591591561562262261711718686g	52
20I-50	R_Var6	1021021311312332331621621711711561562262261711718686g	53
20I-50	R_Var7	1021021311312302301621621591591561562242241711718686g	54
20I-50	R_Var8	1021021311312302301621621711711561562242241711718686g	55
20I-52	R1	1021021331332382381621621711711751752242241711718686g	56
20I-52	R2	1021021331332542541621621711711751752242241711718686g	57
20I-53	R_Var1	1021021331332512511621621591591561562262261711718686g	58
20I-53	R_Var2	1021021331332512511621621591591561562262261731738686g	59
20I-53	R_Var3	1021021331332562561621621591591561562262261711718686g	60
20I-53	R_Var4	1021021331332562561621621591591561562262261731738686g	61
20I-54	R_Var1	98981331332382381621621591591561562242241711718686g	62
20I-54	R_Var2	1261261331332542541621621591591561562242241711718686g	63
20I-54	R_Var4	1261261331332382381621621591591561562242241711718686g	64
20I-55	R1	1081081331332582581621621711711781782242241951958686g	65
20I-56	R1	102102133133254254162162001781782092091951958686g	66
20I-57	R1	1081081331332202201621621591591561562092091711718686g	67
678-1	R_Var1	1021021331332332331621621591591561562242241711718686g	68
678-2	R_Var2	1021021331332542541621621591591561562242241711718686g	69
678-3	R_Var3	1021021331332332331621621591591781782242241711718686g	70
678-4	R_Var4	1021021331332542541621621591591781782242241711718686g	71
679	R1	989800258258162162159159156156001711718686g	72
680	R1	102102133133287287162162159159156156001711718686g	73
681	R1	1021021311312542541621621591591561562242241711718686g	74

Додаток 8

Код	Генотип	GA1A1 9	GA1A19	RICA18	RICA18	RICA2a3 4	RICA2a34	RICA1b5	RICA1b5	Rrid013 A	Rrid013A
451	LLR	98	104	190	190	144	144	119	131	285	301
452	LR	98	102	190	190	144	144	119	131	285	301
453	мозаїк	98	104	190	190	144	144	119	131	285	301
454	LLR	98	104	190	190	144	144	119	131	287	301
455	LLR	98	104	190	190	144	144	119	131	287	301
456	LR	98	104	190	190	144	144	119	131	287	301
458	LLR	98	102	190	190	144	144	119	131	287	301
459	LR	98	104	190	190	144	144	119	131	287	301
460	LLR	98	102	186	186	144	144	119	133	285	301
461	LLR	98	98	186	186	144	144	119	133	285	301
462	LR	98	98	186	186	144	144	119	131	285	301
463	LR	98	98	186	186	144	144	119	131	285	301
464	LR	98	98	186	186	144	144	119	133	285	301
465	LR	98	98	186	186	144	144	119	131	285	301
466	LLR	98	98	186	186	144	144	119	133	285	301
467	LLR	98	98	186	186	144	144	119	131	285	301
468	LR	98	98	186	186	144	144	119	133	285	301
469	LR	98	102	186	186	144	144	119	133	285	301

Ко д	Геноти п	Re1Caga1 0	Re1Caga1 0	Rrid059 A	Rrid059 A	Re2Caga 3	Re2Caga 3	RICA 5	RICA 5	Rrid082 A	Rrid082 A
451	LLR	96	96	100	123	258	258	256	256	168	168
452	LR	96	96	100	123	258	258	256	256	162	162
453	мозаїк	96	96	100	123	242	242	250	250	168	168
454	LLR	96	96	100	123	242	242	256	256	162	162
455	LLR	96	96	100	123	258	258	256	256	168	168

456	LR	96	96	100	123	242	242	256	256	168	168
458	LLR	96	96	100	123	242	242	256	256	162	162
459	LR	96	96	100	123	258	258	256	256	168	168
460	LLR	83	83	100	123	230	230	256	256	162	162
461	LLR	83	83	100	123	230	230	256	256	162	162
462	LR	83	83	100	123	251	251	252	252	162	162
463	LR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162
464	LR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162
465	LR	83	83	100	123	230	230	250	250	162	162
466	LLR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162
467	LLR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162
468	LR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162
469	LR	83	83	100	123	251	251	256	256	162	162

Код	Генотип	Res17	Res17	CA1a27	CA1a27	Rrid171A	Rrid171A	Gala23	Gala23	Rrid064 A	Rrid064A
451	LLR	159	159	112	112	156	156	120	120	226	226
452	LR	159	159	112	112	175	175	120	120	224	224
453	мозаїк	159	159	0	0	0	0	0	0	0	0
454	LLR	159	159	112	112	156	156	120	120	226	226
455	LLR	159	159	112	112	156	156	120	120	224	224
456	LR	159	159	112	112	156	156	120	120	224	224
458	LLR	159	159	112	112	175	175	120	120	224	224
459	LR	159	159	112	112	156	156	120	120	224	224
460	LLR	0	0	112	112	175	175	120	120	226	226
461	LLR	159	159	112	112	175	175	120	120	226	226
462	LR	0	0	112	112	156	156	120	120	226	226
463	LR	159	159	112	112	156	156	120	120	226	226
464	LR	159	159	112	112	175	175	120	120	226	226
465	LR	159	159	112	112	156	156	120	120	0	0

466	LLR	0	0	112	112	175	175	120	120	226	226
467	LLR	159	159	112	112	175	175	120	120	226	226
468	LR	0	0	112	112	175	175	120	120	226	226
469	LR	159	159	112	112	175	175	120	120	226	226

Код	Геноти п	Rrid135A	Rrid135A	Res22	Res22
451	LLR	193	193	86	86
452	LR	173	173	84	84
453	мозаїк			84	84
454	LLR	173	173	84	84
455	LLR	193	193	86	86
456	LR	193	193	86	86
458	LLR	193	193	86	86
459	LR	173	173	84	84
460	LLR	193	193	86	86
461	LLR	173	173	84	84
462	LR	193	193	86	86
463	LR	173	173	84	84
464	LR	173	173	84	84
465	LR	173	173	84	84
466	LLR	193	193	86	86
467	LLR	173	173	84	84
468	LR	193	193	86	86
469	LR	173	173	84	84

Додаток 9. Д – дорослий, П – пуголовок. М – самець, F – самиця

Код	Вік	Геном	GA1A19	GA1A19	RICA18	RICA18	RICA2a34	RICA2a34	RICA1b5	RICA1b5	Re1Caga10	Re1Caga10
20D-04	Д	LR	98	102	186	186	144	144	119	135	96	96
20D-22	Д	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	0	0
20D-38	Д	LRR	98	108	186	186	142	142	133	133	96	96
20D-42	Д	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	0	0
481	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	96	96
482	П	LRR	98	126	184	184	142	142	119	131	0	0
483	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
484	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
485	П	RR	102	102	0	0	0	0	131	131	0	0
486	П	RR	102	126	0	0	0	0	131	131	0	0
487	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
488	П	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
489	П	LR	94	102	184	184	142	142	119	131	96	96
490	П	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	0	0
491	П	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	0	0
492	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
493	П	RR	98	98	0	0	0	0	131	133	0	0
494	П	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	0	0
495	П	RR	102	102	0	0	0	0	131	135	0	0
496	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
497	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
498	П	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	0	0
499	П	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	0	0
500	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
501	П	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
502	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	112	112
503	П	RR	102	102	0	0	0	0	133	135	0	0
504	П	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
505	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
506	П	LR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	112
507	П	RR	98	102	0	0	0	0	131	131	0	0

508	Π	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	112	112
509	Π	LR	98	102	188	188	142	142	119	131	96	96
511	Π	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
512	Π	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	0	0
513	Π	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	83	83
514	Π	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
515	Π	LRR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	112
516	Π	RR	102	102	0	0	0	0	131	133	112	112
517	Π	LR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
518	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	112	112
519	Π	RR	102	102	0	0	0	0	131	135	0	0
520	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
521	Π	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	112	112
522	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	112	112
523	Π	LR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
524	Π	RR	102	102	0	0	0	0	131	131	0	0
525	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	112	112
526	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
527	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
528	Π	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	83	83
529	Π	LR	98	102	186	186	142	142	119	131	96	96
530	Π	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	0	0
531	Π	RR	102	102	0	0	0	0	131	133	0	0
532	Π	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
533	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	112	112
534	Π	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
535	Π	LLR	98	126	184	184	142	142	119	131	96	96
536	Π	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
537	Π	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
538	Π	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	83	83
539	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	112	112
540	Π	LR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	96
541	Π	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	83	83
542	Π	LR	98	98	184	184	142	142	119	131	96	96
543	Π	LRR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
544	Π	LR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	96

545	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
546	II	LRR	98	102	184	184	142	142	0	0	96	96
547	II	RR	98	98	0	0	0	0	133	133	0	0
548	II	RR	102	108	0	0	0	0	131	133	83	83
549	II	LR	98	102	186	186	0	0	133	133	96	96
550	II	RR	102	102	0	0	0	0	131	133	0	0
551	II	RR	102	102	0	0	0	0	131	133	83	83
552	II	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	83	83
553	II	LR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
554	II	RR	102	108	0	0	0	0	133	133	0	0
555	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	112	112
556	II	RR	102	108	0	0	0	0	131	133	0	0
557	II	RR	102	102	0	0	0	0	131	133	0	0
558	II	LR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
559	II	LR	98	102	184	184	142	142	119	133	96	96
560	II	RR	102	102	0	0	0	0	133	133	0	0
561	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
562	II	LR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	96
563	II	LRR	98	98	184	184	144	144	0	0	96	112
564	II	LRR	98	98	184	184	144	144	0	0	96	112
565	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	112	112
566	II	LR	98	102	184	184	142	142	119	131	96	96
567	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
568	II	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	0	0
569	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
570	II	LRR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	96
571	II	RR	98	102					131	133	0	0
572	II	LR	98	98	186	186	142	142	119	131	0	0
573	II	LRR	94	102	184	184	142	142	119	133	96	96
574	II	RR	98	102	0	0	0	0	133	133	83	83
575	II	RR	98	102	0	0	0	0	131	133	0	0
576	II	RR	102	126	0	0	0	0	131	131	0	0
577	II	LR	98	98	184	184	142	142	119	133	96	96
578	II	LR	98	126	184	184	142	142	119	133	96	96

Код	Вік	Геном	RICA1b20	RICA1b20	RICA1b20	Re2Caga3	Re2Caga3	RICA5	RICA5	Rrid082A	Rrid082A	Res17	Res17
20D-04	Д	LR	100	123		217	217	263	263	162	162	171	171
20D-22	Д	RR	123	123		238	258	0	0	162	162	171	171
20D-38	Д	LRR	100	123		225	270	263	263	162	162	171	171
20D-42	Д	RR	123	127		247	274	0	0	162	168	171	171
481	П	RR	100	123		225	225	0	0	162	168	159	159
482	П	LRR	123	125		233	242	263	263	162	162	171	171
483	П	RR				233	258	0	0	162	168	159	159
484	П	RR	123	123		238	258	0	0	162	164	171	171
485	П	RR	123	125		217	263	0	0	162	168	159	171
486	П	RR	125	125		220	230	0	0	162	168	171	171
487	П	RR	123	123		258	258	0	0	162	168	159	159
488	П	LR	100	123		230	230	260	260	168	168	171	171
489	П	LR	100	123		238	238	0	0	162	162	0	0
490	П	RR	123	123		230	247	0	0	162	162	159	171
491	П	RR	123	123		217	238	0	0	162	162	171	171
492	П	RR	123	125		217	258	0	0	162	162	171	171
493	П	RR	123	123		217	254	0	0	162	168	171	171
494	П	LR	123	125				263	263	162	162	159	159
495	П	RR						0	0	162	168	159	159
496	П	RR	123	123		230	278	0	0	162	162	159	171
497	П	RR	123	125		217	258	0	0	162	162	171	171
498	П	RR	123	123		233	242	0	0	162	162	171	171
499	П	RR	123	123		233	238	0	0	162	168	159	159
500	П	RR	123	125		233	242	0	0	162	162	159	171
501	П	LR	100	123		254	254	263	263	162	162	171	171
502	П	RR	123	123		242	247	0	0	168	168	171	171
503	П	RR	123	127		238	242	0	0	168	168	171	171
504	П	RR	123	123		173	254	0	0	162	162	159	171
505	П	RR	123	123		217	258	0	0	162	168	171	171
506	П	LR	100	123		238	238	263	263	168	168	171	171
507	П	RR	123	123		233	238	0	0	162	162	171	171
508	П	RR	123	123		242	247	0	0	162	168	171	171
509	П	LR	100	131		225	225	263	263	168	168		
511	П	RR	123	131		233	258	0	0	162	168	159	159
512	П	RR	123	123		233	233	0	0	162	162	171	171

513	II	RR	123	125		220	225	0	0	162	162	159	159
514	II	RR	123	125		217	258	0	0	162	168	171	171
515	II	LRR	100	123	125	225	258	263	263	162	164	171	171
516	II	RR	123	123		242	247	0	0	162	168	171	171
517	II	LR	100	123		225	225	263	263	162	162	171	171
518	II	RR	125	125		217	217	0	0	162	162	171	171
519	II	RR	125	127		217	263	0	0	162	162	159	171
520	II	RR	123	123		230	274	0	0	162	168	159	171
521	II	RR	123	123		217	217	0	0	162	168	171	171
522	II	RR	123	123		217	217	0	0	162	168	171	171
523	II	LR	100	123		230	230	260	260	168	168	0	0
524	II	RR	123	125		217	263	0	0	162	168	159	171
525	II	RR	123	123		217	217	0	0	162	162	171	171
526	II	RR	123	123		230	238	0	0	168	168	171	171
527	II	RR	123	123		217	258	0	0	168	168	171	171
528	II	RR	123	123		230	258	0	0	162	168	171	171
529	II	LR	100	127		247	247	260	260	162	162	0	0
530	II	RR	123	123		217	274	0	0	162	168	171	171
531	II	RR	123	123		233	278	0	0	162	168	171	171
532	II	RR	123	123		233	247	0	0	162	162	171	171
533	II	RR	123	123		207	233	0	0	162	162	159	159
534	II	LR	100	123		230	230	263	263	168	168	0	0
535	II	LLR	100	133		230	230	256	263	162	162	171	171
536	II	LR	100	131		220	220	263	263	162	162	171	171
537	II	LR	100	125		242	242	263	263	162	162	0	0
538	II	RR	123	123		230	258	0	0	162	168	159	168
539	II	RR	123	123		217	263	0	0	162	168	171	171
540	II	LR	100	123		233	233	263	263	168	168	171	171
541	II	RR	123	123		258	274	0	0	162	162	171	171
542	II	LR	100	131		217	217	263	263	162	162	159	159
543	II	LRR	100	123		220	270	263	263	162	162	171	171
544	II	LR	100	123		230	230	263	263	162	162	159	159
545	II	RR	123	123		230	233	0	0	162	168	171	171
546	II	LRR	100	123		217	233	263	263	162	168	171	171
547	II	RR	123	123		233	238	0	0	162	168	159	168
548	II	RR	123	123		233	238	0	0	162	162	159	159

549	П	LR	100	123		230	230	263	263	168	168	171	171
550	П	RR	123	123		263	274	0	0	168	168	171	177
551	П	RR	123	123		217	238	0	0	162	162	171	177
552	П	RR	123	123		217	274	0	0	162	168	171	179
553	П	LR	100	123		238	238	263	263	0	0	0	0
554	П	RR	123	123		233	254	0	0	162	162	171	177
555	П	RR	123	123		233	278	0	0	162	162	171	177
556	П	RR	123	123		230	247	0	0	162	168	171	177
557	П	RR	123	123		233	258	0	0	162	162	159	171
558	П	LR	100	125		233	233	263	263	162	162	159	159
559	П	LR	100	125		217	217	263	263	162	162	171	171
560	П	RR	123	123		217	217	0	0	162	168	171	171
561	П	RR				233	258	0	0	162	168	159	159
562	П	LR	100	123		242	242	263	263	168	168	159	159
563	П	LRR	100	123		247	258	263	263	162	168	159	171
564	П	LRR	100	123		247	258	263	263	162	168	159	171
565	П	RR	123	123		233	278	0	0	162	168	159	171
566	П	LR	100	123		247	247	260	260	168	168	159	159
567	П	RR	123	123		217	258	0	0	162	162	171	171
568	П	RR	123	127		247	254	0	0	162	162	171	171
569	П	RR	123	125		230	233	0	0	162	168	171	171
570	П	LRR	100	123		242	258	263	263	162	162	171	171
571	П	RR	123	123		230	233	0	0	162	164	171	171
572	П	LR				230	230	263	263	162	162	159	159
573	П	LRR	100	123		247	247	0	0	162	162	171	171
574	П	RR	123	123		230	258	0	0	162	168	159	159
575	П	RR	123	123		225	233	0	0	162	162	171	171
576	П	RR	125	125		230	238	0	0	162	168	171	171
577	П	LR	100	123		258	258	263	263	168	168	171	171
578	П	LR	100	123		230	230	263	263	162	162		

Код	Вік	Геном	CA1a27	CA1a27	Rrid171A	Rrid171A	Ga1a23	Ga1a23	Rrid064A	Rrid064A	Rrid135A	Rrid135A	Res22	Res22
20D-04	Д	LR	104	104	183	183	112	112	226	226	171	171	86	86
20D-22	Д	RR	0	0	156	175	0	0	209	226	171	171	86	86
20D-38	Д	LRR	104	104	156	156	112	112	229	229	171	181	86	86

20D-42	Д	RR	0	0	156	175	0	0	209	226	171	171	86	86
481	П	RR	0	0	156	156	0	0	224	224	171	195	86	86
482	П	LRR	104	104	183	183	112	112	226	226	195	195	86	86
483	П	RR	0	0	175	175	0	0	224	224	171	181	86	86
484	П	RR	0	0	175	183	0	0	224	224	206	206	86	86
485	П	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	195	84	88
486	П	RR	0	0	156	160	0	0	226	226	171	206	86	86
487	П	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	181	86	86
488	П	LR	104	104	175	175	112	112	226	226	171	171	86	86
489	П	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
490	П	RR	0	0	175	183	0	0	226	226	171	206	86	86
491	П	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	181	195	86	86
492	П	RR	0	0	175	175	0	0	209	226	181	195	86	86
493	П	RR	0	0	156	183	0	0	226	226	181	206	84	86
494	П	LR	104	104	175	175	112	112	209	209	171	171	86	86
495	П	RR	0	0	156	183	0	0	224	224	171	195	86	88
496	П	RR	0	0	156	160	0	0	224	224	181	181	86	86
497	П	RR	0	0	175	175	0	0	209	226	181	195	86	86
498	П	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	206	206	86	86
499	П	RR	0	0	156	174	0	0	224	224	171	206	86	86
500	П	RR	0	0	156	156	0	0	224	224	171	195	86	86
501	П	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	173	173	86	86
502	П	RR	0	0	156	160	0	0	209	226	195	195	86	86
503	П	RR	0	0	175	175	0	0	224	226	171	171	84	86
504	П	RR	0	0	160	178	0	0	209	209	171	171	86	86
505	П	RR	0	0	156	175	0	0	209	226	181	195	86	86
506	П	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
507	П	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	193	86	86
508	П	RR	0	0	156	160	0	0	209	226	195	195	86	86
509	П	LR	104	104	156	156	112	112	229	229	181	181	86	86
511	П	RR	0	0	175	175	0	0	224	224	171	181	86	86
512	П	RR	0	0	156	178	0	0	226	226	171	206	86	86
513	П	RR	0	0	156	156	0	0	229	229	195	195	86	86
514	П	RR	0	0	156	175	0	0	209	226	181	195	86	86
515	П	LRR	104	104	175	175	112	112	224	224	195	195	86	86
516	П	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	195	195	86	86

517	II	LR	104	104	183	183	112	112	226	226	195	195	86	86
518	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	195	86	86
519	II	RR	0	0	156	183	0	0	224	224	171	195	86	88
520	II	RR	0	0	175	175	0	0	224	224	171	206	86	86
521	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	171	86	86
522	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	171	86	86
523	II	LR	104	104	183	183	112	112	226	226	171	171	86	86
524	II	RR	0	0	156	175	0	0	209	226	171	195	84	88
525	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	171	86	86
526	II	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	206	86	86
527	II	RR	0	0	175	175	0	0	209	226	171	173	86	86
528	II	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	171	195	86	86
529	II	LR	104	104	156	156	112	112	226	226	195	195	86	86
530	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	195	86	86
531	II	RR	0	0	156	156	0	0	224	224	195	195	86	86
532	II	RR	0	0	156	156	0	0	209	226	206	206	86	86
533	II	RR	0	0	175	175	0	0	224	224	171	195	86	86
534	II	LR	104	104	175	175	112	112	226	226	206	206	86	86
535	II	LLR	104	104	156	156	112	112	229	229	195	195	86	86
536	II	LR	104	104	156	156	112	112	226	226	171	171	86	86
537	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	195	195	86	86
538	II	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	171	195	86	86
539	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	195	86	86
540	II	LR	104	104	175	175	112	112	0	0	195	195	86	86
541	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	195	86	86
542	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
543	II	LRR	104	104	156	156	112	112	229	229	173	173	86	86
544	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
545	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	195	195	86	86
546	II	LRR	104	104	183	183	112	112	226	226	171	171	86	86
547	II	RR	0	0	175	175	0	0	229	229	171	206	86	86
548	II	RR	0	0	175	183	112	112			171	171	86	86
549	II	LR	0	0	156	156	112	112	226	226	171	171	86	86
550	II	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	171	195	86	86
551	II	RR	0	0	175	175	0	0	226	226	171	171	86	86
552	II	RR	0	0	175	183	0	0	226	226	171	171	86	86

553	II	LR	104	104	175	175	112	112	209	209	171	171	86	86
554	II	RR	0	0	156	175	0	0	226	226	171	173	86	86
555	II	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	206	206	86	86
556	II	RR	0	0	175	175	0	0	224	224	206	206	86	86
557	II	RR	0	0	156	156	0	0	224	224	171	171	86	86
558	II	LR	104	104	156	156	112	112	224	224	171	171	86	86
559	II	LR	104	104	156	156	112	112	226	226	181	181	86	86
560	II	RR	0	0	156	183	112	112	0	0	171	171	86	86
561	II	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	181	86	86
562	II	LR	104	104	156	156	112	112	209	209	195	195	86	86
563	II	LRR	112	112	156	156	120	120	226	226	206	206	86	86
564	II	LRR	112	112	156	156	120	120	226	226	206	206	86	86
565	II	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	206	206	86	86
566	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	195	195	86	86
567	II	RR	0	0	156	175	0	0	224	224	171	206	86	86
568	II	RR	0	0	156	156	112	112	0	0	171	206	86	86
569	II	RR	0	0	175	175	0	0	226	229	195	195	86	86
570	II	LRR	104	104	175	175	112	112	226	226	171	171	86	86
571	II	RR	0	0	156	156	112	112	224	224	171	195	86	86
572	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86
573	II	LRR	112	112	160	160	0	0	226	226	171	206	86	86
574	II	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	171	195	86	86
575	II	RR	0	0	156	175	0	0	209	209	181	181	86	86
576	II	RR	0	0	156	156	0	0	226	226	206	206	86	86
577	II	LR	104	104	156	156	112	112	229	229	171	171	86	86
578	II	LR	104	104	156	156	112	112	0	0	171	171	86	86

Додаток 10

Код	Геном	Мультилокусний генотип (МЛГ)	№ клональної лінії
578	L	184184142142263263104104112112100100g	1
577	L	184184142142263263104104112112100100g	1
570	L	184184142142263263104104112112100100g	1
562	L	184184142142263263104104112112100100g	1
559	L	184184142142263263104104112112100100g	1
558	L	184184142142263263104104112112100100g	1
553	L	184184142142263263104104112112100100g	1
546	L	184184142142263263104104112112100100g	1
544	L	184184142142263263104104112112100100g	1
543	L	184184142142263263104104112112100100g	1
542	L	184184142142263263104104112112100100g	1
540	L	184184142142263263104104112112100100g	1
537	L	184184142142263263104104112112100100g	1
536	L	184184142142263263104104112112100100g	1
534	L	184184142142263263104104112112100100g	1
517	L	184184142142263263104104112112100100g	1
515	L	184184142142263263104104112112100100g	1
506	L	184184142142263263104104112112100100g	1
501	L	184184142142263263104104112112100100g	1
566	L	184184142142260260104104112112100100g	2
523	L	184184142142260260104104112112100100g	2
488	L	184184142142260260104104112112100100g	2
494	L	18418414214226326310410411211200g	3
482	L	18418414214226326310410411211200g	3
489	L	18418414214200104104112112100100g	4
573	L	1841841421420011211200100100g	5
535	L	184184142142256263104104112112100100g	6
549	L	1861860026326300112112100100g	7
529	L	186186142142260260104104112112100100g	8
572	L	18618614214226326310410411211200g	9
509	L	188188142142263263104104112112100100g	10
563	L	184184144144263263112112120120100100g	11

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:57:10 05.12.2023

Назва файлу з підписом: Fedorova_diss.pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 5.9 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Fedorova_diss.pdf

Розмір файлу без підпису: 5.9 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: ФЕДОРОВА АННА ОЛЕГІВНА

П.І.Б.: ФЕДОРОВА АННА ОЛЕГІВНА

Країна: Україна

РНОКПП: 3468703107

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 14:57:07 05.12.2023

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000993E35016A5E9F04

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Серійний номер носія особистого ключа: 020

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAAdES)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований