

**РІШЕННЯ**  
**разової спеціалізованої вченої ради**  
**про присудження ступеня доктора філософії**

Разова спеціалізована вчена рада Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, м. Харків №3854 прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії галузі знань 09 - Біологія на підставі прилюдного захисту дисертації «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)» за спеціальністю 091- Біологія

"19" лютого 2024 року.

Пустовалова Елеонора Сергіївна 1995 року народження, громадянка України, освіта вища: закінчила у 2019 році Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна за спеціальністю 091 Біологія.

Дисертацію виконано у Харківському університеті імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, м. Харків

Науковий керівник Шабанов Дмитро Андрійович, доктор біологічних наук (03.00.16 – екологія), професор, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, професор кафедри зоології та екології тварин

Здобувачка має 16 наукових праць, з яких 1 стаття у зарубіжному науковому виданні, що входить до наукометричних баз Scopus, Web of Science, 2 статті у фахових виданнях України, 4 статті, що додатково відображають результати дослідження та 9 робіт апробаційного характеру:

1. Pustovalova E., Choleva L., Shabanov D., Dedukh D. The high diversity of gametogenic pathways in amphispemic water frog hybrids from Eastern Ukraine. PeerJ. 2022. No. 10. e13957. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.13957>
2. Fedorova A., Pustovalova E. 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». 2021. No. 37. P. 70–78. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-6>
3. Drohvalenko M., Pustovalova E., Fedorova A. First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh River basin (Kharkiv region, Ukraine). Biodiversity, ecology and experimental biology. 2021. No. 23 (2). P. 61–67. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>
4. Drohvalenko M., Fedorova A., Pustovalova E. Unexpected Heterochrony in Edible Frog (*Pelophylax esculentus* Linnaeus 1758) and Pallas' Spadefoot (*Pelobates vespertinus* Pallas 1771) in Eastern Ukraine. Reptiles & Amphibians. 2022. No. 29 (1). P. 472–74. <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>
5. Fedorova A., Pustovalova E., Drohvalenko M. High Frequency of Hindlimb Malformation in Froglets *Pelophylax sp.* in Ukraine. The Herpetological Bulletin. 2023. No. 164. P. 24–25. <https://doi.org/10.33256/hb164.2425>
6. Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue derived from the tail tips of tadpoles. Journal of Vertebrate Biology. 2022. No. 71(22010). DOI: <https://doi.org/10.25225/jvb.22010>
7. Kryvoltsevich A., Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. Anomalies in Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) and hybrid waterfrogs (*P. esculentus*) (Anura: Ranidae) from two ponds in the Kharkiv Region of Ukraine. Reptiles & Amphibians. 2022. No. 29(1). P. 204–209. DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.16446>

У дискусії взяли участь голова і члени разової спеціалізованої вченої ради:

**Голова Страшнюк В. Ю.**, доктор біологічних наук (спеціальність 03.00.15 – генетика), старший науковий співробітник, професор кафедри генетики та цитології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Зауваження: немає.

Питання:

1. Ви робите висновок, що в середньому у вас рівень анеуплоїдії у гібридів – 14%. А що у вихідних батьківських видів, чи є інформація, який там рівень анеуплоїдії?
2. Ви припускаєте наявність у гібридів геному якогось третього виду. Що це може бути за вид? Які ще присутні у наших водоймах зелені жаби, які б могли бути джерелом цього геному третього у гібридів?
3. Цей вид, *P. kurtmuelleri*, він раніше у нас спостерігався?
4. Интрогресії можливі тільки якщо цей вид присутній в цих популяційних системах або зараз, або раніше був присутній? Це можуть бути інвазії?
5. Слайд 23, будь ласка. На слайді представлені шлях 1 і 2 – елімінація неклонального геному. Як ви розрізняєте, який геном клональний, який неклональний? Як ви знаєте, що елімінується саме неклональний геном?

**Опонент Струс В. О.**, кандидат біологічних наук (спеціальність 03.00.08 – зоологія), завідувач еколого-гідробіологічної лабораторії Львівського національного університету імені І. Франка

Зауваження:

1. Сторінка 2 “762 зелених жаб”, напевно, мало б бути “762 особини групи зелених жаб”. • Перелік умовних скорочень, сторінка 22 - з технічного, якщо нижче є переклад англійської назви методу на українську, то, ймовірно, було б добре уніфікувати це для усіх умовних скорочень. Також, було б добре Ples289 додати до списку умовних скорочень, за аналогією до RrS1 – *Rana ridibunda* sequence 1.
2. Сторінка 51 - “... Morozov-Leonov, 2017, 2021a, б, 2023 Dedukh, Krasikova, 2022” перед Dedukh і після 2023 бракує “;”
3. Сторінка 56 - “Вона не обов’язково вища для геномів, що передаються клонально, порівняно з гномами, що передаються статевим шляхом.”, очевидно, здобувач мала на увазі, що порівнювати необхідно із “геномами” а не “гномами”.
4. Сторінка 57 - “Це відбувається через те, що елімінація геному відбувається поступово шляхом відкидання кожної з хромосом видаляемого геному (Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020).” краще було б “ з хромосом видаляемого геному” перефразувати на “ з хромосом геному, що видаляється”.
5. Сторінка 61 - “Системи R-E були знайдені та описані на території Австрії (Tunner, Heppich-Tunner, 1992), Германії (Mayer et al., 2013),...”, мабуть, мова іде про Німеччину. Аналогічне побажання на сторінці 63 рукопису, а саме: “Системи E-типу, так звані «чисті» системи, які складаються виключно з гібридів, і де масові дослідження підтвердили відсутність дорослих особин обох батьківських видів, поширені на території Данії (Rybacki, 1994; Christiansen et al., 2005; Christiansen, Reyer, 2009), Швеції (Christiansen et al., 2010; Hoffmann, Reyer, 2013), Германії (Graf, Polls-Pelaz, 1989; Berger, Berger, 1994; Pruvost et al., 2013b; Hoffmann, Reyer, 2013),...”.
6. Сторінка 77 - “Рис. 1.1. Карта із субрегіонами геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex (дозвіл на використання таблиці надано одним із авторів, Шабановим Д. А., посилання – Шабанов та ін., 2017).”, напевно, мова іде про дозвіл на використання рисунка, а не таблиці.
7. Сторінка 87, останнє речення підпису до Рис 2.2. – “Більш детальні морфологічні відмінності надані у Рис. 2 (Атемасова та ін., 2019).” посилається здобувач, ймовірно, на Рис. 1.2.

8. Сторінка 101 – “До висушеного осаду додавали воду (~50 мкл).” я так розумію, що мова іде про воду спеціально очищену для ПЛР, але, можливо, краще було б це уточнити в рукописі.
9. Сторінка 106 – в тексті є посилання на Рис. 9А, але в рукописі такого рисунку нема, можливо, здобувач мала на увазі Рис. 3.1А. Аналогічне на ст. 108 – “(Рис. 9Б)” можливо мав би бути Рис. 3.1Б. Таке ж на сторінці 110 – посилання на “(Рис. 9В)” очевидно мало б бути Рис 3.1В. Аналогічне є на сторінці 112 де посилання спершу іде на “Рис. 9.” а через два рядки знову на “(Рис. 9Г)”. Таке ж на сторінці 150, є посилання на “(Рис. 9; Додаткова табл. 2)”.
10. Сторінка 112 - “...одна дорослі самка *P. ridibundus* та 26 дорослих особини *P. esculentus*...”, якщо самиця була одна, тоді краще слово “доросла”.
11. Сторінка 149 – “4.1.2. ГПС заплави р. Мож” текст назви підрозділу не є виділений жирним.
12. Сторінка 160 – Рис. 4.2. добре було б зробити більш контрастним, оскільки не усе легко читається. Аналогічне побажання до “Додатковий рис. 3.” із сторінки 218.
13. Сторінка 163 - “Такі клітини під час мейозу самців зареєстровані у великій кількості, і це призводить до зниження фертильності таких самців (Doležálková et al., 2016) Крім того,...” бракує крапки після посилання на джерело інформації, тим паче, після починається нове речення.
14. Сторінка 246, Додаткова таблиця 3, для кращої орієнтації було б добре в попередній таблиці мати порядкові номери, про які тут ідеться або ж навести тут код особини та рік збору, бо важко зрозуміти, яка саме особина є 353 в Додатковій таблиці 2.
15. Сторінка 251, підпис до Додаткової таблиці 6 - “Рожевий - хромосоми (біваленти або уніваленти) *P. lessonae*;...” ймовірно, здобувач мала на увазі “червоний”, оскільки рожевого кольору, який мав би відображати хромосоми жаби ставкової, в таблиці не згадується.

#### Питання:

1. На 36-37 сторінках здобувач перераховує переваги асексуального розмноження. Як на мене, асексуальне розмноження не є надто вигідним чи, тим паче, перевагою оскільки втрачається мінливість потомства, а, отже, здебільшого, втрачається і пластичність у пристосуванні. Хотіла б уточнити, чи вважає здобувач клональність перевагою у випадку зелених жаб?
2. Здобувач детально описує обсяг та походження матеріалу а також методи, які було використано під час дослідження. Частина розділу, де представлено методи є насиченою ілюстраціями результатів під час роботи із різними методами, що показує рівень володіння описаними методиками. В роботі було використано 8 різних методів, які є складними та трудомісткими за своїм алгоритмом виконання. На жаль, мені не зрозуміло, чому використано саме таку кількість тварин при кожній із описаних методик (ст. 3 рукопису - “52 дорослих самців *P. esculentus* (30 гібридних самців з Нижнього Добрицького ставу, 7 самців з Корякова ставу, 8 самців з річки Мож, 7 самців з Іськова ставу)”, або ж ст. 101 рукопису - “Для більш детального вивчення гаметогенезу і аналізу формування бівалентів у мейозі, для чотирьох особин ми виконали порівняльну геномну гібридизацію...”) Чи не краще було б уніфікувати кількість самців, із кожної водойми, для кожного із використаних методів? Також, цікавить, чому не з усіх самців було відібрано уринальну сперму, для співставлення даних по кожній особині в межах одного локалітету і між самими локалітетами?
3. Під час вивчення матеріалу виникло запитання щодо вибірки із Іськового ставу. На ст. 105 – Рис. 3.1А показує, що після 2021 року не відбирали земноводних із Іськового ставу. Чому тварин перестали відловлювати? Також, на ст. 107 - Таблиця 3.1 здобувач показує склад вибірок з Іськового ставу та її вклад в роботу, але не бачу 2016 року, проте на Рис. 3.1А, 2016 рік є. Що відбулося із 2016 роком в таблиці?
4. Припускаю, що на ст. 108 є механічна опечатка, оскільки диплоїди мали б мати еритроцити таки менше 28 мкм.: “Методом цитометрії еритроцитів 43 гібриди були визначені, як диплоїдні, тобто мали еритроцити більше 28 мкм.”
5. На ст. 110, ймовірно, автоматична помилка. Якщо було виявлено 41 гібрид, то не може в дужках подаватися 11 а потім ще 50, ймовірно, мало бути 30? “Вибірка 2020 року складалася з 46 особин, серед яких була одна диплоїдна ювенільна особина, чотири дорослі особини *P. ridibundus* (один

- самець, три самки) та 41 дорослої особини *P. esculentus* (11 триплоїдів (три самці, вісім самок) та 50 диплоїдів (26 самців, чотири самки)).”
6. На ст. 131 здобувач пише: “В іншого самця (№867) ми не знайшли сперматид на предметних скельцях із суспензією клітин сім’яників, що свідчить про те, що цей самець був стерильним.” Питання в наступному, які припущення щодо стерильності цього самця? Бачу, що біваленти метафази 1 є, чи було щось цікаве в пластинках чи ядрах цього самця і чи не намагалися взяти в нього уринарну сперму?
  7. На ст. 134 здобувач демонструє Рис. 3.9 а в підписі пише, що, цитата: “Метафази в мейозі II (В, Г) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (В); 13 унівалентів *P. lessonae* (Г).”, проте на фотографіях не очевидно є різниця між бі- та унівалентами. Як саме відбувалося встановлення фази поділу та яка різниця між пластинками рис. 3.9А та 3.9В?
  8. На ст. 140 здобувач пише: “Це свідчить про відсутність інтрогресії між геномами *P. ridibundus* та *P. lessonae*.” і, очевидно, мова іде про ядерну ДНК, проте, цікаво чи перевіряли ймовірність інтрогресії мтДНК? Це може бути однією зі причин стерильності самців.
  9. На ст. 143 здобувач демонструє унікальну знахідку ймовірності присутності в геномі спадкової інформації третього виду, цитую (далі йдеться про Рис. 3.12Л-О): “...3) сині – ті, які зафарбовувалися лише у DAPI-барвник і в яких не детектувався ані геном *P. ridibundus*, ані геном *P. lessonae*, ...” з чим, окрім, ймовірної інтрогресії третього геному, це може бути пов’язано і які припущення щодо цього третього виду?
  10. Здобувач на 144 ст. пише про аномальну кон’югацію хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Що, на думку здобувача, може бути результатом та причиною такої аномальної кон’югації? Чи можемо ми тоді говорити, що сперматозоїди таких особин несуть геном виключно одного з батьківських видів?
  11. Сторінка 147 - “Проте, нещодавні дослідження показали, що ця система складається із як мінімум дев’яти клональних ліній *P. lessonae*,” Скільки є клональних ліній озерної жаби на думку здобувача в ГПС Іськова та Н. Добрицького ставів? Чи плануєте ви перевірити на унікальність клональні лінії жаби озерної для кожної із водойм? І чи виключає здобувач ймовірність періодичної міграції на розмноження до цих водойм жаби ставкової?
  12. Сторінка 168 - ”Беручи до уваги, що гібридні самці в основному продукують суміш геномів R і L (Рис. 4.2), тоді як самки та триплоїдні гібриди з генотипом LRR продукують гамети R і RL, (тобто гібриди, отримують лессонівський геном від батька-гібрида), очікувалося б, що частка гібридів мала б знижуватись, а частка особин *P. ridibundus* мала б збільшуватись.” Цікаво було б оцінити коєволюцію клональних ліній із мітохондріальною ДНК, в якій також можливі інтрогресії, і незначні неспівпадіння в спільній роботі мтДНК та ядерної ДНК можуть вплинути на метаболізм/виживання і т.д. Це може стосуватися як батьківської форми, так і гібридних особин. Тим паче, якщо є підозра на інтрогресію третього виду в ядерній ДНК. Чи планує здобувач продовжувати дослідження в цьому напрямку?

**Опонент Єрмоленко С. В.**, кандидат біологічних наук (спеціальність 03.00.16 – екологія), без звання, старший науковий співробітник НДІ гідробіології, іхтіології та радіобіології НДІ біології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Зауваження:

1. На сторінці 73 про надається інформація про те, що сусідні з Сіверським Донцем Харківської області регіони мають значно нижчий рівень різноманітності зелених жаб. При цьому в тексті не наводиться, яке саме “різноманіття” розглядає автор. Скоріш за все здобувачка розглядала генетичне різноманіття, що варто було зазначити в тексті.
2. На сторінці 85 здобувачка надає інформацію щодо районів досліджень, де відломлювались особини з популяцій зелених жаб. При цьому надаються координати у десятичному форматі з шістьма знаками в дробовій 5 частині. Скоріш за все матеріал був зібраний не в окремій точці, а на певній ділянці. Тому більш доцільно було округлити значення до третього або четвертого знаку.

3. На сторінці 88 вказується, що відбір біологічного матеріалу для каріологічного аналізу відбувався шляхом умертвіння та анатомічного розтину жаб. Було б бажано додати інформацію щодо подальших заходів з утилізації біологічного матеріалу.
4. На рисунку 3.1 представлено графіки коливання чисельності дорослих особин *P. esculentus* complex із чотирьох досліджених локалітетів. По осі ординат представлені відсоткові значення та не надається підпис, тому не зрозуміло, про яку саме чисельність йде мова. Також у тексті авторка не наводить інформацію про що свідчать показники динаміки чисельності у відповідному графічному матеріалі.
5. На сторінках 107, 109, 111 у таблицях надається інформація про загальну кількість проаналізованих особин зелених жаб (дорослі та ювенільні особини). Оскільки це первина інформація, можливо було доцільно зробити ці таблиці у вигляді додатків.

Питання:

1. Чи є наразі якісь загрози, які можуть сплинути на стан геміклональних популяційних систем, які ви досліджували?

**Опонент Сурядна Н. М.**, кандидат біологічних наук (спеціальність 03.00.08 – зоологія), доцент, завідувач кафедри екології та інформаційних технологій відокремленого структурного підрозділу закладу вищої освіти „Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна» Мелітопольського інституту екології та соціальних технологій”

Зауваження:

1. Важливо розуміти, що якщо види не занесені до Червоної книги України, то це не означає, що вони не підлягають охороні. Збереження типових і широко поширених видів потребує особливих підходів, оскільки саме вони забезпечують стабільне функціонування регіональних біосистем, а в умовах міжвидової гібридизації, як одного з сучасних напрямків видоутворення збереження таких видів надзвичайно важливе.
2. Дуже ретельний опис результатів основного розділу дисертації потребує короткого узагальнення у кінці розділу.
3. Підписи до рисунків дуже обширні з поясненнями. Громіздкі також назви деяких додаткових таблиць. Варто, все ж таки давати пояснення в тексті, або як примітку до таблиці.
4. Напрошується в роботі каріотипування і хоча б кілька розкладок пластинок з показовими результатами. Сама метафазна пластика не дає такого уявлення і візуалізації результатів.
5. У висновках і по тексту результати надаються у кількостях особин, що вбачається не зовсім коректним. Все ж таки бажано надавати такі результати у відсотках задля розуміння частки або внеску того чи іншого матеріалу відносно досліджуваних процесів.
6. Відмічено, що Ag-фарбування не тільки виявляє райони ядерцевих організаторів, а й надає всім хромосомами жовто-коричневий колір, що в поєднанні з барвником Гімза робить хромосоми більш чіткими. На мою думку і власний досвід, це все ж таки більше залежить від акуратності і наполегливості дослідника, що проявляється у чіткому дотриманні методів приготування і забарвлення хромосомних препаратів. Зазначу, що отримати якісні пластинки для аналізу – це велика трудомістка робота, так само як і подальше їх фотографування, обробка та аналіз, тому робота дослідниці заслуговує неймовірної поваги

Питання:

1. В роботі зазначено, що остаточне визначення плідності особини проводили за допомогою підрахунку хромосом із соматичних клітин не менше, ніж в семи повних метафазних пластинках. Чому саме сім пластинок? Чи є обґрунтування щодо кількості пластинок, які необхідно залучити до аналізу?
2. На рисунку 3.1. представлені графіки коливання чисельності дорослих особин *P. esculentus* complex, які методи використовували для обрахунку чисельності?

3. Виявлені аномалії сім'яників стосувались лише різних розмірів, чи можливо були іще якісь інші типи порушень. І чи траплялись дорослі гібридні самці без резонаторів?
4. Цікава кількісна і якісна характеристика анеуплоїдних мітотичних пластинок. Чи прослідковується якась закономірність втрати тих чи інших гомологів або цілих пар. Якщо так, то яких хромосом, крупних чи дрібних, чи тих і тих, тощо?
5. Напрошується уточнення, скільки все ж таки у відсотках встановлено триплоїдів окремо в кожній досліджуваній популяційній системі?
6. Важливим є припущення про наявність генетичного матеріалу, зокрема хромосом іншого виду зелених жаб, який бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*. Цікаво, що це за вид може бути?

**Рецензент Навроцька В. В.**, кандидат біологічних наук (спеціальність 03.00.15 – генетика), доцент кафедри генетики та цитології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Зауваження:

1. У розділі 3.2 при описі результатів аналізу плоїдності гібридних самців з допомогою методу Аг-фарбування доцільно було б додати фото клітин з пофарбованими ядерцями та ядерцевими організаторами мітотичних хромосом.
2. Рис. 3.3 має назву “Визначення плоїдності та складу геному в сперматоцитах і сперматидях самців *P. esculentus* з Іськова ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus*”, але в описі до нього згадуються і соматичні клітини, з відповідними фотографіями.
3. У кількох місцях тексту (с. 6, 157, 158, 171) при поясненні механізмів збереження чи елімінації геному одного з батьківських видів йдеться про різну здатність прикріплення хромосом до кінетохора. Оскільки кінетохор формується на центромері, більш коректним було б говорити про різну здатність центромерних ділянок хромосом різних видів прикріплювати білки кінетохору.
4. У тексті наявна незначна кількість друкарських помилок.

Питання:

1. Чи можна вже на даному етапі ваших досліджень говорити про фактори, які можуть індукувати рекомбінації, які ви спостерігали? Можливо якісь екологічні фактори? Вибір шляху гаметогенезу чим може скеровуватись або регулюватись?

Результати відкритого голосування:

"За" 5 членів ради,  
"Проти" немає членів ради,  
“Утримались” немає членів ради

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Пустоваловій Елеонорі Сергіївні ступінь доктора філософії з галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 - Біологія.

Голова разової спеціалізованої вченої ради

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Страшнюк В. Ю.  
(прізвище, ініціали)

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 17:07:12 20.02.2024

Назва файлу з підписом:

Пустовалова\_Е\_С\_Рішення\_разової\_вченої\_спецради\_про\_присудження\_доктора.pdf.asice

Розмір файлу з підписом: 169.7 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису:

Пустовалова\_Е\_С\_Рішення\_разової\_вченої\_спецради\_про\_присудження\_доктора.pdf

Розмір файлу без підпису: 176.3 КБ

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

Підписувач: СТРАШНЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

П.І.Б.: СТРАШНЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

Країна: Україна

РНОКПП: 2253400916

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 17:07:06 20.02.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000444F320100209804

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2023.12.21 13:00