

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПУСТОВАЛОВА ЕЛЕОНОРА СЕРГІЇВНА

УДК: 597.8:575

ДИСЕРТАЦІЯ
ЦИТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ВІДТВОРЕННЯ
ДИПЛОЇДНИХ ГІБРИДНИХ САМЦІВ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ
(*PELOPHYLAX ESCULENTUS* COMPLEX)

Спеціальність 091 – Біологія
(09 – Біологія)

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

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

_____ Е. С. Пустовалова
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

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

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Пустовалова Е. С. Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*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, 2023.

Дисертаційна робота присвячена встановленню особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. У ході роботи визначалися особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *Pelophylax esculentus* із досліджених геміклональних популяційних систем (ГПС) Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб: Нижнього Добрицького ставу, Корякова ставу, Іськова ставу (околиці с. Гайдари), заплави р. Мож (с. Тимченки). На підставі отриманих даних встановлювались шляхи гаметогенезу у досліджених гібридних самців та був оцінений їх внесок у підтримання складу геміклональних популяційних систем.

Матеріал за участю автора роботи збирали протягом 2016-2022 років. Збір вибірок зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex відбувався з природних місцеперебувань. Всього було проаналізовано 762 зелених жаби роду *Pelophylax*. Визначення таксономічної приналежності зелених жаб проводилося за комплексом морфологічних ознак (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2005; Шабанов, 2015). Попереднє визначення плоїдності проводилося за допомогою цитометрії еритроцитів (Бондарева и др., 2012), а згодом підтверджено Ag-, DAPI-зabarвленням хромосом на каріологічних препаратах (Howell, Black 1980; Birstain, 1984; Ragghianti et al., 1995; Ogielska et al., 2004; Вегерина и др., 2013; Бірюк, 2016). Додатково, проводили

цитометрію сперматозоїдів на зразках, отриманих з уринальної сперми самців (Степаненко і др., 2017). Встановлення каріотипів соматичних тканин і сім'яників проводили за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) (Ragghianti et al., 1995; Pustovalova et al., 2022, 2023; Choleva et al., 2023), і для деяких особин підтверджували за допомогою порівняльної геномної гібридизації (CGH) (Zalesna et al., 2011; Doležalková et al., 2016).

За результатами досліджень, кожен із чотирьох локалітетів населяють особини *P. ridibundus* та *P. esculentus* (ди- та триплоїдні), а отже, такі ГПС належать до R–E–Er–ГПС типу. Для того, щоб зрозуміти, як саме відбувається успішне відтворення гібридів у ГПС, необхідно з'ясувати механізми, що забезпечують розмноження гібридних самців, проаналізувавши склад їх статевих продуктів. Тому, для оцінки вкладу гібридних самців у відтворення цих систем, випадковим чином обрали 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) і дослідили їх гаметогенез шляхом встановлення складу геному в їх сперматоцитах та сперматидях. З використанням FISH із видоспецифічними до перицентромерних ділянок хромосом *P. lessonae* та *P. ridibundus* зондами Ples289 та RrS1 відповідно, показано, що з 52 досліджених диплоїдних гібридних самців п'ять особин мали у сім'яниках сперматоцити та сперматиди виключно із геномом *P. lessonae*, а 13 особин — виключно з геномом *P. ridibundus*. 29 особин в одних сперматоцитах та сперматидях мали геном *P. lessonae*, а в інших — геном *P. ridibundus*; за запропонованою нами термінологією, ці особини є амфігаметними. Ще у 8 самців з 52, що були досліджені, у сім'яниках зареєстровано диплоїдні сперматоцити та поодинокі диплоїдні сперматиди.

Попри переважну передачу гібридами в досліджуваних ГПС геномів R, в цих ГПС щороку спостерігається велика частка гібридів і наявність лише одиничних дорослих особин *P. ridibundus*. Більшість проаналізованих

сперматоцитів та сперматид (60%) мали геном R, та лише 33% сперматоцитів та сперматид мали геном L. Це не відповідає наявним науковим уявленням, згідно з якими гібриди продукують переважно гамети із геномом виду, який відсутній в ГПС, де вони відтворюються, як це відбувається в L–E–ГПС, де гібриди передають виключно геном R (Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022).

Додатково, за результатами FISH, у п'яти самців з 52, що були досліджені, в мейотичних хромосомних пластинках зареєстровано кон'югацію між хромосомами різних видів (*P. lessonae* та *P. ridibundus*) у біваленти. При чому, у трьох таких особин спостерігалися сперматиди як з геномом *P. lessonae*, так і з геномом *P. ridibundus*, тобто такі самці були амфігаметні. Один із самців, для якого було зареєстроване явище незвичайної кон'югації, мав сперматоцити та сперматиди із геномом *P. ridibundus* та невелику кількість сперматоцитів із геномом RR. Для перевірки та пояснення цього явища, була застосована методика CGH із геномами обох батьківських видів. Щоб уникнути методологічних помилок, у якості контролю, використали двох самців, які продукували лише один тип гамет. За результати CGH зафарбування, було підтверджено, що ці самці дійсно продукували лише один тип гамет, а хромосоми із їх соматичних тканин рівномірно зафарбовувалися у кольори, що відповідають батьківським геномам, таким чином підтверджуючи гібридну природу таких особин.

Деякі хромосоми двох особин, для яких було зареєстроване явище незвичайної кон'югації хромосом різних видів, після проведеного CGH із геномами обох батьківських видів демонстрували зафарбовування різних ділянок у кольори, що є характерними для обох батьківських видів. Це може бути свідченням вдалої рекомбінації між хромосомами різних видів. Крім того, у 2 самців на препаратах після CGH можна спостерігати наявність хромосом, що не належать ані *P. lessonae*, ані *P. ridibundus*, зафарбовуючись лише DAPI. Оскільки вірогідність методологічних помилок було нівельовано

за допомогою наявності контрольних особин, висувається припущення, що ці хромосоми належать якомусь іншому виду зелених жаб, генетичний матеріал якого бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*, оскільки неодноразово було показане явище інтрогресії споріднених геномів у геноми *P. ridibundus* (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010).

У ході виконання роботи, зареєстровано шість шляхів гаметогенезу, які характерні для гібридних самців *P. esculentus*:

- 1) продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. lessonae* (L);
- 2) продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. ridibundus* (R);
- 3) продукування суміші гаплоїдних гамет, деякі з яких несуть геном L, а інші несуть геном R (феномен гібридної амфігаметності);
- 4) продукування диплоїдних гамет зі складом геномів RR, LL, LR;
- 5) продукування анеуплоїдних (кількість хромосом не кратна 13) гамет (як із геномом L, так і із геномом R);
- б) продукування гамет із сумішшю двох або трьох геномів одночасно внаслідок взаємної рекомбінації геномів *P. lessonae*, *P. ridibundus* та, ймовірно, інтрогресії частини генетичного матеріалу ще одного виду зелених жаб.

Згідно з результатами, отриманими в ході роботи, можна зробити висновок, що наявність 14% анеуплоїдних клітин серед проаналізованих сперматоцитів та сперматид свідчить про недосконалість регуляції елімінації та ендореплікації у клітинах зародкової лінії міжвидових гібридів, як було запропоновано у сучасних дослідженнях елімінації геному у гібридів зелених жаб (Chmielewska et al., 2018). Анеуплоїдність є наслідком порушення вибіркової премейотичної елімінації одного із геномів (Ogielska et al., 2014; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020; Dedukh, Krasikova, 2022). Механізми, які забезпечують елімінацію геному у зелених жаб вивчені недостатньо. Базуючись на даних, отриманих під час досліджень механізмів елімінації у гібридних рослин (Fukagawa, Earnshaw, 2014; Ishii et al., 2016;

Musacchio, Desai, 2017; Bloom, Costanzo, 2017), можна припустити, що відмінності в кількості копій центромерного повтору в геномах різних батьківських видів можуть спричинити неправильне розташування та відставання хромосом *P. lessonae* під час розмноження гоноцитів. Наслідком цього має бути те, що у гібридних особин хромосоми *P. ridibundus* є більш здатними прикріплюватися до кінетохорів під час поділу гоноцитів, і це є причиною їх більш успішної клональної передачі у гамети (Sanei et al., 2011; Marimuthu et al., 2021).

Наукова новизна отриманих результатів полягає в отриманні даних фундаментального характеру, які пов'язані з розкриттям особливостей гаметогенезу самців зелених жаб, включаючи цитологічні аспекти амфігаметності та проявів рекомбінації. Результати досліджень роблять внесок у виявлення механізмів, що забезпечують подолання репродуктивних бар'єрів у міжвидових гібридів тварин. Розуміння цитологічних особливостей відтворення міжвидових гібридів важливе з практичної точки зору для збереження біорізноманіття інших гібридних комплексів та проведення майбутніх моніторингових та біоіндикаційних досліджень. Матеріали роботи можуть бути використані під час викладання таких навчальних курсів як «Зоологія хребетних тварин», «Цитологія та клітинна біологія», «Батрахологія та герпетологія», тощо. Зафіксований матеріал, зібраний авторкою, зберігається в колекції Лабораторії популяційної екології амфібій Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, а також у Музеї природи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

У зв'язку з повномасштабним вторгненням роботу над дисертацією було продовжено на базі Інституту фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чеська Республіка) під керівництвом д-ра Лукаса Холєви та д-ра Дмитра Дідуха; грант № RRFU-22-21 (01.05.2022 – 31.12.2023), Researchers at Risk

Fellowship – UKRAINE, наданий Чеською академією наук (the Czech Academy of Sciences (CAS)).

Ключові слова: зелені жаби, *Pelophylax*, мейоз, гаметогенез, сперматогенез, FISH, геміклональна популяційна система, диплоїд, триплоїд, хромосома, бівалент, ендоредуплікація, елімінація, поліплоїди

ANNOTATION

Pustovalova E. S. Cytogenetic Mechanisms of Reproduction of Diploid Hybrid-Male Water Frogs (*Pelophylax esculentus*). – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the degree of Philosophy Doctor (PhD) in the field of Biology, Programme subject area – 091 Biology. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023.

The dissertation work focuses on establishing the features of gametogenesis in hybrid males of *Pelophylax esculentus* complex from hemiclinal population systems of the Siverskyi-Donets Center of Water Frog Diversity. In the course of the work, the characteristics of karyotypes and the species composition of genomes were determined in mitotic and meiotic testis cells of adult diploid males of *Pelophylax esculentus* from the investigated hemiclinal population systems (HPS) of the Siverskyi-Donets Center of Water Frog Diversity: Lower Dobrytskyi pond, Koriakiv pond, Iskiv pond (vicinity of Haidary village), floodplains of the Mozh River (vicinity of Tymchenky village). Based on the obtained data, gametogenic pathways were established in the studied hybrid males, and their contribution to maintaining the composition of hemiclinal population systems was assessed.

The author collected the material over the years 2016-2022, actively participating in the collection of samples from natural habitats of water frogs belonging to *Pelophylax esculentus* complex. A total of 762 water frogs, classified under the genus *Pelophylax*, underwent analysis. Taxonomic classification relied on a set of morphological features (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2005; Шабанов, 2015).

To determine the preliminary ploidy, erythrocyte cytometry was initially employed (Бондарева и др., 2012). Subsequently, confirmation was obtained through Ag- and DAPI-staining of chromosomes in karyological preparations (Howell, Black 1980; Birstain, 1984; Ragghianti et al., 1995; Ogielska et al., 2004; Вегерина и др., 2013; Бірюк, 2016). Additionally, sperm cytometry was

performed using samples obtained from male urinary sperm (Степаненко та ін., 2017).

The karyotyping of somatic tissues and testes was carried out using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Ragghianti et al., 1995; Pustovalova et al., 2022, 2023; Choleva et al., 2023), and in some cases, confirmation was obtained through comparative genomic hybridization (CGH) (Zalesna et al., 2011; Doležalková et al., 2016).

Based on the research results, each of the four localities is inhabited by individuals of *P. ridibundus* and *P. esculentus* (di- and triploid). Consequently, these HPSs fall into the R–E–Ep–HPS type. To comprehensively understand the mechanisms underlying successful hybrid reproduction in the water frog population systems, it is imperative to investigate the processes governing the reproduction of hybrid males. Therefore, to assess the contribution of hybrid males to the reproductive success of these systems, 52 adult males of *P. esculentus* were randomly selected (30 hybrid males from Lower Dobrytskyi Pond, 7 males from Koriakiv Pond, 8 males from the Mozh River, 7 males from Iskiv Pond).

Their gametogenesis was examined by determining the genome composition in their spermatocytes and spermatids. Using Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with Ples289 and RrS1 probes specific to the pericentromeric regions of *P. lessonae* and *P. ridibundus* chromosomes, respectively, it was revealed that out of the 52 diploid hybrid males examined, five individuals exclusively had spermatocytes and spermatids with the *P. lessonae* genome in their testes, while 13 individuals exclusively had the genome of *P. ridibundus*. For 29 individuals, the *P. lessonae* genome was observed in some spermatocytes and spermatids, while the *P. ridibundus* genome was present in others; following our proposed terminology, these individuals are classified as amphigametic. Additionally, diploid spermatocytes and single diploid spermatids were recorded in the testicles of another 8 out of the 52 males examined.

Despite the prevalent transmission of R genomes by hybrids in the investigated HPS, a substantial number of hybrids and the presence of only single adults of *P. ridibundus* are observed in these HPS every year. The majority of analyzed spermatocytes and spermatids (60%) exhibited the R genome, while only 33% showed the L genome. This contradicts the current scientific understanding that hybrids predominantly produce gametes with the genome of a species absent from the host where they reproduce. This pattern is typically observed in L–E–HPS, where hybrids exclusively transmit the R genome (Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022).

Additionally, based on the FISH results, pairing between chromosomes of different species (*P. lessonae* and *P. ridibundus*) in bivalents was observed in meiotic metaphases in five out of the 52 examined males. Furthermore, three of these individuals exhibited spermatids with both *P. lessonae* and *P. ridibundus* genomes, classifying them as amphigametic. One of the males, for whom the unusual pairing phenomenon was reported, displayed spermatocytes and spermatids with the *P. ridibundus* genome and a small number of spermatocytes with the RR genome.

To verify and explain this phenomenon, the Comparative Genomic Hybridization (CGH) technique was applied using the genomes of both parental species. To minimize methodological errors, two males that produced only one type of gametes were used as controls. The results of the CGH staining confirmed that these control males indeed produced only one type of gamete. The chromosomes from their somatic tissues uniformly stained in colors corresponding to the parental genomes, thus confirming the hybrid nature of such individuals.

After performing CGH with the genomes of both parental species on two individuals, for which the unusual pairing of chromosomes from different species was observed, certain chromosomes displayed staining in different areas with colors characteristic of both parental species. This observation suggests potential evidence of successful recombination between chromosomes of different species.

Additionally, in two males, chromosomes that did not belong to either *P. lessonae* or *P. ridibundus* were identified in preparations after CGH, showing staining only with DAPI. Given the presence of control individuals to minimize the probability of methodological errors, it is proposed that these chromosomes belong to some other species of water frogs. It is speculated that the genetic material of this unidentified species is involved in the hybridization of *P. lessonae* and *P. ridibundus*, as the phenomenon of introgression of related genomes into *P. ridibundus* genomes has been previously demonstrated (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010).

During the course of the study, six distinct modes of gametogenesis were identified, characteristic of hybrid males of *P. esculentus*:

1. Production of haploid gametes with the genome of *P. lessonae* (L).
2. Production of haploid gametes with the genome of *P. ridibundus* (R).
3. Production of a mixture of haploid gametes, where some carry the L genome, and others carry the R genome (referred to as the phenomenon of hybrid amphigameticity).
4. Production of diploid gametes with RR, LL, and LR genome compositions.
5. Production of aneuploid gametes (with the number of chromosomes not being a multiple of 13), both with the L genome and the R genome.
6. Production of gametes with a mixture of two or three genomes simultaneously, resulting from the mutual recombination of the genomes of *P. lessonae*, *P. ridibundus*, and potentially the introgression of genetic material from another species of water frogs.

Based on the results obtained during this study, it can be concluded that the presence of 14% aneuploid cells among the analyzed spermatocytes and spermatids indicates imperfections in the regulation of elimination and endoreplication in the germ cells of interspecies hybrids. This aligns with contemporary studies on the elimination of genomes in water frog hybrids

(Chmielewska et al., 2018). Aneuploidy is considered a consequence of selective premeiotic elimination of one of the genomes (Ogielska et al., 2014; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020; Dedukh, Krasikova, 2022).

The mechanisms governing genome elimination in water frogs have not been extensively studied. Drawing insights from the study of elimination mechanisms in hybrid plants (Fukagawa, Earnshaw, 2014; Ishii et al., 2016; Musacchio, Desai, 2017; Bloom, Costanzo, 2017), it can be hypothesized that differences in the number of centromeric repeat copies in the genomes of different parental species may lead to misalignment and lagging of *P. lessonae* chromosomes during gonocyte multiplication. Consequently, in hybrid individuals, *P. ridibundus* chromosomes may have a higher propensity to attach to kinetochores during gonocyte division, contributing to their more successful clonal transfer to gametes (Sanei et al., 2011; Marimuthu et al., 2021).

The scientific novelty of the obtained results lies in the acquisition of fundamental data pertaining to the elucidation of male water frog gametogenesis, encompassing cytological aspects of amphigameticity and manifestations of recombination. The research outcomes contribute significantly to understanding the mechanisms that facilitate the overcoming of reproductive barriers in interspecies hybrid animals. This comprehension of cytological features in the reproduction of interspecies hybrids holds practical importance for preserving biodiversity within other hybrid complexes and for conducting future monitoring and bioindicative studies.

The materials from this study can be utilized in the teaching of educational courses such as “Zoology of Vertebrate Animals”, “Cytology and Cell Biology”, “Batrachology and Herpetology” etc. The recorded material, collected by the author, is stored in the collection of the Laboratory of Amphibian Population Ecology at V. N. Karazin Kharkiv National University, as well as in the Nature Museum of V. N. Karazin Kharkiv National University.

Due to the full-scale invasion, work on the dissertation continued at the Institute of Animal Physiology and Genetics in Libečoh, Czech Republic. The work was performed under the supervision of Dr. Lukáš Choleva and Dr. Dmytro Didukh, supported by grant No. RRFU-22-21 (05/01/2022 - 12/31/2023) as part of the Researchers at Risk Fellowship – UKRAINE, provided by the Czech Academy of Sciences (CAS).

Keywords: water frogs, *Pelophylax*, *Pelophylax esculentus*, meiosis, gametogenesis, spermatogenesis, FISH, hemiclinal population system, diploid, triploid, chromosome, bivalent, endoreduplication, elimination, polyploid

СПИСОК

**наукових публікацій здобувача вищої освіти ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»
кафедри зоології та екології тварин Пустовалової Елеонори Сергіївни,
які висвітлюють наукові результати дисертації
на тему «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних
самців зелених жаб *Pelophylax esculentus complex*»**

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Публікації у міжнародних наукових виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. Pustovalova E., Choleva L., Shabanov D., Dedukh D. The high diversity of gametogenic pathways in amphispermic water frog hybrids from Eastern Ukraine. PeerJ. 2022. No. 10. e13957. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.13957> (Scopus, Web of Science, Q1, IF=3.06)

Abstract: Interspecific hybridization can disrupt canonical gametogenic pathways, leading to the emergence of clonal and hemiclinal organisms. Such gametogenic alterations usually include genome endoreplication and/or premeiotic elimination of one of the parental genomes. The hybrid frog *Pelophylax esculentus* exploits genome endoreplication and genome elimination to produce haploid gametes with chromosomes of only one parental species. To reproduce, hybrids coexist with one of the parental species and form specific population systems. Here, we investigated the mechanism of spermatogenesis in diploid *P. esculentus* from sympatric populations of *P. ridibundus* using fluorescent *in situ* hybridization. We found that the genome composition and ploidy of germ cells, meiotic cells, and spermatids vary among *P. esculentus* individuals. The spermatogenic patterns observed in various hybrid males suggest the occurrence of at least six diverse germ cell populations, each with a specific premeiotic genome

elimination and endoreplication pathway. Besides co-occurring aberrant cells detected during meiosis and gamete aneuploidy, alterations in genome duplication and endoreplication have led to either haploid or diploid sperm production. Diploid *P. esculentus* males from mixed populations of *P. ridibundus* rarely follow classical hybridogenesis. Instead, hybrid males simultaneously produce gametes with different genome compositions and ploidy levels. The persistence of the studied mixed populations highly relies on gametes containing a genome of the other parental species, *P. lessonae*.

Key words: Amphispermy; Bivalents; FISH; Gametogenesis; Hybridogenesis; Meiosis; *Pelophylax*; Spermatid

(Особистий внесок здобувача: дисертантка самостійно обробила весь матеріал: зафіксувала тканини, провела флуоресцентну гібридизацію in situ на препаратах хромосом та проаналізувала отримані дані, на основі яких описала шляхи гаметогенезу у гібридних самців зелених жаб).

Публікація у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України:

1. Drohvalenko M., Fedorova A., Pustovalova E., Shabanov D. 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. DOI: <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>.

Abstract: *Pelophylax esculentus* is an interspecies hybrid of marsh frog *P. ridibundus* and pool frog *P. lessonae*. The hybrids are usually presented by diploid and triploid forms, and coexist and crossbreed with one or both parental species in the hemiclinal population systems (HPS). Siverskyi Donets river basin is known for its diversity of HPS and was described as Siverskyi Donets center of water frogs diversity. Three subregions were described within it based on the HPS composition features (diploid R-E, triploid-containing R-E-Ep and R-Epf with triploid females only among hybrids). The presence of triploid *P. esculentus* was earlier confirmed only for two of three subregions of the Siverskyi Donets river

basin, while the third, R-E subregion (including Mozh river) was thought to be inhabited by only diploids. Here we present the results of analysis on ploidy and genome composition of both adult and juvenile water frogs in a pond in the Tymchenky village (Mozh river basin, Kharkiv region, Ukraine). Three samples of frogs were collected in September 2019, June 2020, and August 2021 (109 adults and 56 juveniles in total) and analyzed using microscopic erythrocyte cytometry (dry smears), karyology of bone marrow, fluorescent staining (with DAPI) and analysis of morphological features. We identified 2 triploid males among adults and 5 triploids of both sexes among juveniles. The overall triploid ratio between ages changed drastically (9% among juveniles vs 1% among adults), but insignificantly ($p=0.078$). The erythrocyte size indicating margin between adult di- and triploids was established as 28 μm for this system; for juveniles such margin is quite unclear. All triploids had genome composition LLR (i.e. two genomes of *P. lessonae* and one genome of *P. ridibundus*). By the majority of diploid *P. esculentus* and the presence of triploids, Tymchenky system appeared similar to some HPSs (Koriakiv, Iskiv systems) in other subregions, known for triploid presence. The presence of triploids, contrary to previous data on this region, may be explained by several hypotheses: (1) rare observation of triploids; (2) migration of either triploids or *P. esculentus* producing $2n$ -gametes; (3) a newly evolved feature of local *P. esculentus* reproduction.

Key words: *Pelophylax esculentus*, *Pelophylax ridibundus*, hemiclinal population system, hybrid, triploid

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: проміри еритроцитів, фіксація тканин; за допомогою методу DAPI зафарбування метафаз мітозу, точно визначила геномну композицію гібридних особин (частину вибірки), базуючись на значеннях інтенсивності забарвлення центромерних ділянок; вперше зареєструвала триплоїдних особин у цьому локалітеті)

2. Pustovalova E., Fedorova A. 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>

Abstract: Interspecies hybrid frogs *Pelophylax esculentus* and one of its parental species *Pelophylax ridibundus* inhabit the Siversky Donets center of diversity of water frogs in Eastern Ukraine. These frogs can crossbreed and form progeny in population systems which are called hemiclinal (HPS). Such systems have their own exceptional features which make them interesting for studying. The Lower Dobrytskiy Pond, which is situated in the National Nature Park “Homilshansky lisy” and is a part of Siversky Donets river basin, is on focus. Current work is devoted to the combination of two methods of spermatogenesis investigation. First, using the method of Ag-staining we observed high variability of meiotic chromosomal plates in testes of 24 adult male water frogs *P. esculentus* ($2n=26$). Only one male had 100% of full meiotic plates with no aneuploid plates. A significant amount of studied males (21/24) produced aneuploid chromosomal plates (4-68% of the total amount of meiotic plates). This may lead to a decrease in their fertility or even to their entire sterility. Also, we have not observed any chromosomal meiotic plates in two of 24 males. Some males (8/24) even produced meiotic chromosomal plates with 26 bivalents (i.e. $4n$ germ cells) which may testify about the ability to produce diploid sperm. Further, the lengths of urinary sperm cells’ heads were measured. Finally, we performed an analysis of both meiotic chromosomes in testes and the distribution of sizes of urinary sperm cells’ heads of hybrid water frogs *Pelophylax esculentus* from Siversky Donets basin to find out if there is a link between these two features. No difference in sperm heads lengths was found between males producing moderate and low amounts of sperm. Based on the data of meiotic plates all males were assigned into five categories via PCA (principal component analysis). A significant difference in sperm heads lengths was found within the category I (males with mostly full meiotic plates).

The analysed data shows that each male from the studied population has his own unique features. No direct link between sperm cells size and features of meiotic chromosomes in testes was found.

Key words: *Pelophylax*, sperm, hybrid, chromosome, meiosis, spermatogenesis

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: фіксація матеріалу, проміри еритроцитів; провела детальний аналіз мейозу гібридних самців і порівняла отримані дані із даними про розміри сперматозоїдів для того, щоб виявити чи відповідає розмір сперми із розподілом метафаз мейозу для кожного самця, і чи можна на основі цих даних відрізнити гаплоїдні і диплоїдні сперматозоїди)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. 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. P. 8-10.

2. Fedorova A., Pustovalova E, Leliukh I., Klymenko R., Polishchuk A. Hemiclonal population system of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from Koryakiv yar pond: results of annual monitoring. 14th International young scientists’ conference “Biology: From a Molecule Up to The Biosphere”, November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine. P. 172-173.

3. 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. P. 185-186.

4. Pustovalova E. Sex-success: a case of hybrid male water frogs. SymbioSE-2021 (24th Symposium of Biology Students in Europe, July, Portugal). P. 33.

5. 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. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 16-18.

6. Zahoruiko Ye., Solohub-Yosef M., Hostkina T., Fedorova A., Drohvalenko M., Pustovalova E. Water frogs from Koriakiv pond: annual monitoring of hemiclinal population system. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 24-26.

7. Pustovalova E., Fedorova A., Drohvalenko M. Exploring *Pelophylax esculentus* systems: first records of triploids in the Mozh river basin. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 13-16

8. Pustovalova E., Dedukh D., Choleva L., Shabanov D. Evolution of gametogenic pathways in reproduction of hybrid males from *Pelophylax esculentus* complex. The 14th European Cytogenomics Conference, Montpellier, France, 1-4 July, 2023. P. 31.

9. Drohvalenko M., Fedorova A., Pustovalova E., Mikulíček P. Molecular data in studies of reproduction in hemiclinal population systems of *Pelophylax esculentus* complex. Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень, матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, смт. Путила, Чернівецька обл., Україна, 12-13 жовтня, 2023.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. 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), 22010. P. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.25225/jvb.22010> (**Scopus, Web of Science, Q2, IF=1.46**).

Abstract: We propose a modified and updated protocol to obtain mitotic chromosomes from the regenerated tissue of *Pelophylax* tadpole tail tips. Chromosomal preparations from regenerated tissue results in high-quality and dean slides suitable for further staining and study. Tadpoles remain alive, undergo minimum suffering, and can be grown to adulthood for further investigation. The method could be used for other groups of Anura and modified for other species with the ability to regenerate their tissues.

Key words: karyoanalysis, *Pelophylax*, polyploidy, regeneration

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу; розробила та вдосконалила метод прижиттєвого отримання хромосом з регенерату хвоста пуголовків)

2. 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>.

Key words: Malformations, brachydactyly, color anomalies, vocalization, population system

(Особистий внесок здобувача: дисертантка дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу та зареєструвала декілька типів аномалій у зелених жаб із двох локалітетів Сіверсько-Донецького центру різноманіття протягом двох років)

3. 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. 472–474. DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>

Key words: reproduction, amphibians, anomaly, metamorph, *Pelophylax*, *Pelobates*

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у детальному описі аномалій у зелених жаб та часничниць)

4. Fedorova A., Pustovalova E., Drohvalenko M. High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetol. Bull.* 2023. No. 164. P. 24-25. DOI: <https://doi.org/10.33256/hb164.2425> (**Scopus, Q3, IF=0.238**)

Key words: anomalies, amphibians, hemimelia, ectromelia, taumelia, *Pelophylax*

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: фіксація матеріалу, визначення плоідності особин за допомогою методу Ag-зафарбування клітин із соматичних тканин, який базується на визначенні кількості ядерце-утворюючих районів, а також зафіксувала декілька типів аномалій у цьогорічків зелених жаб)

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

FISH – Fluorescent *in situ* hybridization

CGH – comparative genomic hybridization

ГПС – геміклональна популяційна система

PBS – Phosphate buffered saline, фосфатно-сольовий буфер

SSC – Saline sodium citrate, цитратно-сольовий буфер

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

R-E-Ep-ГПС – геміклональна популяційна система, яка представлена дорослими особинами обох статей *P. ridibundus* (R), диплоїдними *P. esculentus* (E) та триплоїдними *P. esculentus* (Ep)

НПП – національний природний парк

dNTP – Deoxynucleotide Triphosphate

dUTP – Deoxyuridine Triphosphate

dATP – Adenine Triphosphate

dTTP – Thymine Triphosphate

dCTP – Cytosine Triphosphate

PFA – paraformaldehyde, параформальдегід

RrS1 – *Rana ridibunda* sequence 1

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ANNOTATION	8
СПИСОК НАУКОВИХ ПУБЛІКАЦІЙ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1 Репродуктивні стратегії у живих організмів - статеве та асексуальне розмноження.....	35
1.2 Різноманіття типів відтворення у гібридів.....	40
1.3 Цитогенетичні механізми відтворення.....	47
1.4 Особливості розмноження гібридів. Елімінація, ендореплікація	49
1.5 Жаби роду <i>Pelophylax</i> , як модельний об'єкт вивчення гібридогенезу ...	53
1.6 Сперматогенез та диференціація гонад у зелених жаб	57
1.7 Типи популяційних систем зелених жаб.....	59
1.8 Методи вивчення популяційних систем і особливостей відтворення зелених жаб, які їх населяють	64
1.9 Історія дослідження зелених жаб на території Харківської області, заплави р. Сіверський Донець	72
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.....	84
2.1 Обсяг та походження матеріалу для досліджень	84
2.2. Методи дослідження	89
2.2.1. Визначення плідності за допомогою методу цитометрії еритроцитів.....	89

2.2.2. Отримання препаратів розкапаних клітин із соматичних та зародкових тканин	90
2.2.3. Виявлення районів ядерцевих організаторів на мітотичних хромосомах та у ядрах соматичних клітин за допомогою методу Ag-фарбування	92
2.2.4. Визначення геному у соматичних клітинах кишківника та / або кісткового мозку у особини за допомогою DAPI фарбування	94
2.2.5. Приготування олігонуклеотидних мічених зондів шляхом ПЛР для мічення геному у клітинах із соматичних тканин та тканин сім'яників... 96	
2.2.6. Визначення геному в клітинах сім'яників гібридних самців за допомогою флуоресцентної гібридизації <i>in situ</i> (FISH).....	97
2.2.7. Отримання препаратів сперми.....	100
2.2.8. Визначення геному в клітинах сім'яників гібридних самців за допомогою порівняльної гібридизації геномів (CGH).....	101
2.2.9. Отримання та обробка фотографій.....	103
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	105
3.1. Дослідження складу ГПС.....	105
3.1.1. Іськів став	106
3.1.2. Заплава р. Мож (с. Тимченки)	108
3.1.3. Нижній Добрицький став.....	109
3.1.4. Коряків став	111
3.2. Дослідження гаметогенезу гібридних самців	113
3.2.1. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців Іськова ставу з використанням тільки зонду із послідовністю RrS1	116
3.2.2. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців Іськова ставку з використанням зондів RrS1 та Ples289	119

3.2.3. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців р. Мож 1) з використанням тільки зонду із послідовністю RrS1	121
3.2.4. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців р. Мож 2) з використанням зондів RrS1 та Ples289	127
3.2.5. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців Корякова ставку за допомогою FISH	129
3.2.6. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців із Нижнього Добрицького ставу за допомогою FISH	132
3.2.7. Аналіз гаметогенезу самців з Нижнього Добрицького ставу за кількісним розподілом сперматид	137
3.2.8. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців із Корякова та Нижнього Добрицького ставків із використанням CGH	140
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	146
4.1. Вклад гібридних самців у підтримку та відтворення гібридів у кожній із ГПС	146
4.1.1. ГПС Іськова та Нижнього Добрицького ставу	146
4.1.2. ГПС заплави р. Мож	149
4.1.3. ГПС Корякова ставу	150
4.2. Гібридогенез у гібридних самців із R-E-ГПС відрізняється від класичних гібридогенетичних шляхів	152
4.3. Амфіспермічні самці та різноманіття продукованих гамет забезпечують відтворення гібридів у різних популяційних системах Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб	158
4.4. Різноманіття шляхів гаметогенезу – переваги та недоліки утворення гамет різного типу	166
ВИСНОВКИ	170

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	172
ДОДАТКИ	208

ВСТУП

Актуальність теми. Біологічні види — еволюційні одиниці, які у типовому випадку відтворюються статевим шляхом. У більшості випадків статеве розмноження забезпечується утворенням редукованих генетично унікальних гамет шляхом мейозу та заплідненням (Coyne, Orr, 2004; Avise, 2005). І утворення гамет, і навіть підтримка меж між статевим відтворюваними видами, забезпечується універсальними механізмами мейозу. Тим не менш, через міжвидову гібридизацію стає можливим порушення консервативних шляхів гаметогенезу, що призводить до багатьох наслідків, серед яких може реєструватися відмова від типового статевого відтворення (Coyne, Orr, 2004). У гібридів часто виникають проблеми з утворенням пар між хромосомами і рекомбінацією в мейозі через розбіжність хромосом батьківського виду (McKee, 2004). Тим не менш, гібриди можуть долати стерильність завдяки роботі різноманітних цитогенетичних механізмів (наприклад, тетраплоїдизації). У багатьох випадках спостерігаються премейотичні або мейотичні зміни у шляхах гаметогенезу, що призводить до утворення клональних гамет (Dawley, Bogart, 1989; Schön et al., 2009; Stöck et al., 2021). Такі зміни можуть бути причиною різноманітних природних клональних і геміклональних способів репродукції, таких як партеногенез, андрогенез, гіногенез, клептогенез і гібридогенез (Dawley, Bogart, 1989; Schön et al., 2009; Stöck et al., 2021). Таким чином, премейотичні або мейотичні зміни розмивають бар'єри між статевим розмноженням і клональністю. Крім того, ці зміни можуть сприяти еволюційному успіху гібридних ліній і гібридного видоутворення (Mallet, 2007; Abbot et al., 2013). Незважаючи на тривалу історію вивчення гібридів, які демонструють зміни у шляхах їх гаметогенезу, особливості процесу утворення їх гамет лишаються недостатньо вивченими. Більше за те, механізми збереження клональних ліній у популяціях і те, як вони впливають на батьківські види, все ще залишається недостатньо вивченими.

Зелені жаби, які утворюють *Pelophylax esculentus* complex, є чудовою групою для дослідження міжвидових гібридів. Їх примітною особливістю є клональне відтворення одного з батьківських геномів у гібридів. Цей комплекс включає два батьківські види, *P. lessonae* (Camerano, 1882) і *P. ridibundus* (Pallas, 1771). Їхня міжвидова гібридизація спричинила утворення диплоїдних гібридів *P. esculentus* Linnaeus, 1758 (Berger et al., 1969). Під час гібридного гаметогенезу один із батьківських геномів видаляється з клітин до початку мейозу, а другий геном ендореплікується та передається у гаметах клонально без рекомбінації (Tunner, Heppich-Tunner, 1991; Chmielewska et al., 2018; Doležálková-Kašánková et al., 2021). У разі, якщо такі гібридні жаби схрещуються з представниками батьківського виду, геном якого був видалений, у потомстві буде відтворений гібридний генотип (Berger et al., 1978). Біосистеми, в яких відбувається відтворення гібридних жаб, названо геміклональними популяційними системами (ГПС) (Шабанов, Литвинчук, 2010; Шабанов 2015; Шабанов та ін., 2017). Склад ГПС завжди пов'язаний з особливостями гаметогенезу гібридів *P. esculentus*, що до них входять (Plötner, 2005). У більш поширених популяціях з особинами *P. lessonae* (системи L-E) гібриди передають геном *P. ridibundus* у гаметах (Pruvost, Hoffmann, Reyer, 2013; Svinin et al., 2013; Chmielewska et al., 2022). Гібриди також можуть співіснувати з *P. ridibundus* (системи R-E). Такі ГПС характерні для двох географічних територій, одна з яких розташована в басейні річки Одер у Центральній Європі, а друга – у декількох річках Східної України. У R-E-ГПС *P. esculentus* демонструють специфічний характер гаметогенезу (Uzzell et al., 1977; Doležálková et al., 2016; Pustovalova et al., 2022). В багатьох популяційних системах *P. esculentus* complex разом з диплоїдними гібридами (генотип LR, $2n = 26$) співіснують триплоїдні і навіть тетраплоїдні особини (Jakob, 2007; Hoffman et al., 2015). В природі виявлено дві форми триплоїдних жаб, що відрізняються за геномним набором. В одному варіанті триплоїдна особина має один геном *P. lessonae* і два геноми

P. ridibundus (генотип LRR, $3n = 39$), а в іншому – два геноми *P. lessonae* і один геном *P. ridibundus* (генотип LLR, $3n = 39$). Масове існування триплоїдів зареєстровано у північній Німеччині, Данії, південній Швеції, західній Польщі та західній Угорщині (Gunther et al, 1979; Tunner, Herrich-Tunner, 1992; Rybacki, Berger, 2001; Arioli et al, 2010), а також у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб (Україна). Триплоїди у таких ГПС грають роль постачальника рекомбінантних геномів та відтворюються завдяки диплоїдним гібридам, що продукують клональні диплоїдні гамети LR.

Одним із ще не вивчених репродуктивних механізмів є здатність самців *P. esculentus* із R–E-систем продукувати два типи гамет одночасно (Vinogradov et al., 1991; Biriuk et al., 2016). Це явище було названо “гібридна амфіспермія” (Vinogradov et al., 1991). Беручи до уваги, що самки *P. esculentus* із R–E-систем також здатні продукувати декілька типів гамет одночасно, було запропоновано змінити назву цього феномену на “гібридна амфігаметність” (Pustovalova et al., 2022). Різноманіття гамет типових статеві відтворюваних видів пов’язано з рекомбінацією у мейозі. Випадок *P. esculentus* є іншим: це єдині відомі науці істоти, що здатні одночасно продукувати гамети з клональним геномом від батька (гаплоїдний геном *lessonae*) і клональним геномом від матері (гаплоїдний геном *ridibundus*). Механізми, які забезпечують такий характер гаметогенезу ще не відомі і заслуговують на детальне дослідження. Саме тому, **мета даного дослідження** — встановити особливості гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Задачі:

1. Обрати модельні геміклональні популяційні системи (ГПС) *Pelophylax esculentus* complex у складі Сіверсько–Донецького центру різноманіття зелених жаб, до складу яких входять диплоїдні гібридні самці.

2. Визначити особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *P. esculentus* із визначених модельних ГПС.

3. Встановити шляхи гаметогенезу у досліджених гібридних самців; визначити внесок таких гібридів у підтримання складу ГПС, до яких вони входять.

Методи дослідження:

- збір репрезентативних вибірок *Pelophylax esculentus* complex з природних місцеперебувань;
- визначення таксономічної приналежності зелених жаб за комплексом морфологічних ознак;
- цитометричне дослідження еритроцитів для попереднього визначення плоїдності;
- встановлення каріотипів соматичних тканин і сім'яників;
- отримання та дослідження розмірів сперматозоїдів з уринальної сперми самців;
- Ag-, DAPI-збарвлення хромосом на каріологічних препаратах;
- встановлення видової приналежності хромосом завдяки флюоресцентній гібридизації *in situ* (FISH);
- порівняльна геномна гібридизація (CGH).

Наукова новизна отриманих результатів. Робота має фундаментальну спрямованість, пов'язану з розкриттям особливостей гаметогенезу гібридних тварин. Результати досліджень роблять істотний

внесок у виявлення механізмів, що забезпечують подолання репродуктивних бар'єрів у міжвидових гібридів тварин. Розуміння цитологічних особливостей відтворення міжвидових гібридів важливе з практичної точки зору для збереження біорізноманіття інших гібридних комплексів та проведення майбутніх моніторингових та біоіндикаційних досліджень. Матеріали роботи можуть бути використані під час викладання таких навчальних курсів як «Зоологія хребетних тварин», «Цитологія та клітинна біологія», «Герпетологія», тощо. Зафіксований матеріал, зібраний авторкою, зберігається в колекції Лабораторії популяційної екології амфібій Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, а також у Державному музеї природи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням дисертантки. Дисертантка провела аналіз літературних джерел за темою, самостійно зібрала переважну частину описаних матеріалів. Також дисертантка самостійно обробила весь наявний матеріал (2016–2022 рр.). Польові дослідження, збір, обробка та визначення матеріалу, отримання хромосомних препаратів та їх подальша камеральна обробка, мікроскопія, аналіз отриманих даних проведені самою дисертанткою. Цитологічний та молекулярно-генетичний аналізи частково проведені на базі Лабораторії генетики риб Інституту фізіології та генетики тварин (Лібехов, Чеська Республіка).

Публікації. Основні результати дисертації відображені у вигляді 1 публікації в закордонному науковому виданні, проіндексованому у базах даних Web of Science та Scopus (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank i / або Journal Citation Reports та 2 статті у виданнях, що на момент публікації входять до переліку наукових фахових видань України. Результати, які додатково відображають наукові результати дисертації опубліковані у вигляді 2 статей в закордонних наукових виданнях,

проіндексованих у базах даних Scopus (Q2 і Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank і / або Journal Citation Reports та 2 статті у виданні, що індексується іншими науковими базами.

Апробація матеріалів дисертації. Доповіді за результатами дисертаційного дослідження представлено й обговорено на чотирьох конференціях, де опубліковано вісім тез доповідей (XIV Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, листопад 2019 (2 тез); Міжнародна зоологічна конференція «Фауна України на межі XX-XXI ст. Стан і біорізноманіття екосистем і природоохоронних територій», Шацьк, вересень 2019, 2021 (4 тез); Міжнародна конференція молодих вчених-біологів (студентів, аспірантів) (Symposium for Biology Students in Europe) – SymBioSe – в онлайн-режимі; 14-ий Європейський конгрес із цитогенетики (The 14th European Cytogenomics Conference – ECA), Монпельє, Франція (1-4 липня, 2023 р.).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 253 сторінках, складається з анотації (українською та англійською мовами), змісту, основної частини, списку використаних джерел (309 посилань) та 3 додатків (Додаток А – список наукових публікацій, Додаток Б – 5 рисунків, Додаток В – 6 таблиць). Основна частина складається з наступних розділів: вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати, обговорення, висновки, та викладена на 126 сторінках (без врахування 9 сторінок, на яких розміщені 9 ілюстрацій, які займають площу всієї сторінки). Текст дисертації містить 22 ілюстрації та 4 таблиць.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Основна частина дисертації виконувалася на базі лабораторії популяційної екології амфібій біологічного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна. У зв'язку з повномасштабним вторгненням роботу над дисертацією було продовжено на базі Інституту фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чеська Республіка) під керівництвом д-ра Лукаса Холеви

та д-ра Дмитра Дідуха; грант № RRFU-22-21 (01.05.2022 – 31.12.2023), Researchers at Risk Fellowship - UKRAINE, наданий Чеською академією наук (the Czech Academy of Sciences (CAS)).

Подяки.

Авторка висловлює щирю вдячність своєму науковому керівнику Шабанову Дмитру Андрійовичу за всебічну підтримку під час роботи над усіма етапами дисертаційного дослідження, а також колегам з Лабораторії популяційної екології амфібій: Коршунову О. В. за натхнення для початку роботи з амфібіями, Бірюк О. В. за колосальну допомогу у пілотних дослідженнях з теми, Дрогваленку М. О. за допомогу у зборах та обробці частини матеріалу, Федоровій А. О. за неоціненну підтримку та допомогу на кожному етапі виконання цієї дисертації, а також за психологічну підтримку протягом чотирьох років сумісної та натхненої праці, Кравченко М. О., Бульбі Є. В., Нестеренко К., Степаненко К., Єрмакову Д., Парамоновій В., Бобровій А. за різноманітну допомогу під час виконання досліджень. Окрему подяку авторка висловлює доктору Дідуху Д. В. за навчання кожної з методик, які використовувалися у даній роботі, незрівнянно інформативні поради та консультації під час проведення експериментів та написання тексту дисертації. Студентам, співробітникам ХНУ імені В. Н. Каразіна та натхненим друзям, які приймали участь у моніторингах під час студентської польової практики (Андрєєву Д., Бірюку І., Шевченку О., Лисенку М., Харіну В., Трохимчуку Р., Фоменко К., Лукану Р., Горенському Г., Поліщук А., Переславській К., Верхотуровій П., Кривольцевич А., Шабанову В., Загоруйко Є., Госткіній Т., Сологуб-Йосефу М., Обіденній К. та ін.). Доктору Коту Ю. Г. за дозвіл користування обладнанням та реактивами лабораторії на базі кафедри біохімії (ХНУ імені В. Н. Каразіна). Доктору Холеві Л. та його родині за допомогу із працевлаштуванням під час повномасштабного вторгнення. Колегам із Інституту фізіології та генетики тварин (Лібехов, Чеська республіка) та колегам з біологічного факультету Львівського

національного університету (Львів, Україна), особливо Гнатчук І., за моральну підтримку під час виконання дисертаційної роботи. Безмежну вдячність висловлюю Збройним силам України за їх силу, мужність та витримку під час оборони України, та за можливість дописати та захистити цю дисертаційну роботу. Доктору Шаропову Б. Р., який у 2019 році повернув любов і натхнення до науки та досліджень, а у 2022 році поклав своє життя за вільну та сильну Україну, боронячи Харківську область. На останок авторка висловлює особливу подяку своїй сім'ї – батькам Пустоваловій В. В. та Пустовалову С. В., та своїм дорогим друзям – Бондаренку Г. М., Козовій М. С. за неосяжну підтримку та любов.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Репродуктивні стратегії у живих організмів - статеве та асексуальне розмноження

Типовий життєвий цикл еукаріотичних організмів включає злиття гаплоїдних клітин з утворенням диплоїдних клітин, які потім у ході мейозу утворюють нові гаплоїдні клітини (Ohkura, 2015). Мейоз зменшує кількість хромосом у клітині вдвічі та створює нові комбінації алелів у дочірніх клітинах шляхом рекомбінації та сегрегації (Zickler, Kleckner, 2015). Ця перестановка генетичного матеріалу необхідна для успіху статевого розмноження. Мейоз вивчали в різних областях, але ці дослідження часто зосереджені на механістичних аспектах процесу (напр. Harigaya, Yamamoto, 2007; Kimble, 2011), а не на його еволюційному значенні. В еволюційній біології мейоз часто спрощують і представляють як випадковий розподіл хромосом і подій рекомбінації, з невеликою увагою до деталей залучених молекулярних і клітинних механізмів (Zhang et al., 2015; Lenormand et al., 2016). Однак останні дослідження виявили багато «дивних» особливостей мейозу, які залишаються невирішеними еволюційними загадками. Уважне вивчення мейозу на кожному рівні може відкрити важливе розуміння його еволюції, виникнення та різноманіття серед еукаріотичних організмів.

Мейоз - це невід'ємна частина статевого розмноження (англ. sexual reproduction), процесу, за допомогою якого двоє батьків вносять генетичний матеріал для створення потомства з унікальними генетичними ознаками (Sawada, Inoue, Iwano, 2014). Однак, не дивлячись на розповсюдженість статевого розмноження, воно має ряд недоліків. Подвійні витрати на статі стосуються двох основних недоліків статевого розмноження порівняно з безстатевим (Smith, Maynard-Smith, 1978). Перша вартість — це демографічна вартість виробництва самців, яка виникає через те, що самці безпосередньо не продукують нових потомків і, отже, знижують загальну

кількість потомків в популяції. При цьому, час, який необхідний для того, щоб з'явилося потомство, є дуже довгим (Schön et al., 2009; Sawada, Inoue, Iwano, 2014). Друга вартість — це те, що для статевого розмноження завжди необхідні дві особини одного і того самого виду, які мають зустрітися у природі, щоб утворити потомство. При чому ці особини мають бути генетично відмінні між собою для того, щоб запобігти близькоспорідним схрещуванням, які можуть призвести до нежиттєздатного потомства.

На відміну від статевого, асексуальне відтворення (англ. asexual reproduction) являє собою процес, який не потребує процесу злиття гамет від самця і самки (Meeûs, Prugnolle, Agnew, 2007). Таким чином, формування тільки одного типу гамет, а саме яйцеклітин, достатньо для розвитку нового організму. Асексуальне відтворення є поширеним механізмом клональності, оскільки потомство утворюється шляхом реплікації генетичного матеріалу одного з батьків. Клональне відтворення може мати як переваги, так і недоліки в асексуальних популяціях (Bogart, Dawley, 1989; Schön et al., 2009; Neaves, Baumann, 2011; Stöck et al., 2021). Суттєвою перевагою асексуального відтворення є те, що для розмноження взагалі достатньо однієї особини. За рахунок цього, процес розмноження теж пришвидшується, що є другою перевагою асексуального розмноження. У результаті цього процесу утворюється потомство, яке за генетичним складом ідентичне батькам, тобто є їх клонами (Bogart, Dawley, 1989; Schön et al., 2009; Neaves, Baumann, 2011; Stöck et al., 2021). У тих випадках, коли вартість виробництва самців стає домінуючим фактором, що впливає на відносну придатність клонового розмноження проти статевого і існують окремі, генетично ізольовані статеві особини та клони, рівень розмноження клонових ліній вдвічі перевищує рівень статевих ліній (Reichel et al., 2016). Це пояснюється тим, що клони повністю складаються з самок, тоді як статеві лінії на 50% складаються з самців, які не роблять внесок у потомство цієї групи. Внаслідок цього,

вартість виробництва самців сильно сприяє клоновому відтворенню в цьому сценарії (Schön et al., 2009).

Таким чином, клональні тварини можуть швидко колонізувати нове середовище, оскільки всі нащадки пристосовані до тих самих умов середовища, що й батьки (Smith, Maynard Smith, 1978). Клонові популяції також можуть мати високий рівень генетичної одноманітності, що може збільшити їх конкурентоспроможність і знизити ризик шкідливих генетичних мутацій в короткостроковій перспективі (Bell, 1982).

Однак клональність може також мати недоліки в нестатевих популяціях в довгостроковій перспективі (Van Valen 1973; Bell 1982). Оскільки всі нащадки генетично ідентичні, вони вразливі до тих самих патогенів та чутливі до змін навколишнього середовища. Це може призвести до швидкого поширення хвороб і вимирання клонових популяцій. Крім того, відсутність генетичного різноманіття в клонових популяціях може обмежити їхній адаптивний потенціал і зробити їх більш уразливими до мінливих умов середовища (Van Valen 1973; Bell 1982; Коці et al., 2020).

Для того, щоб клональне розмноження мало значну подвійну перевагу над статевим, клонові організми повинні дійсно виробляти вдвічі більше потомства, ніж статеві (Avisé, 2008; Schön et al., 2009). Однак ця перевага може бути значно зменшена в деяких видів, наприклад у соціально моногамних птахів, де самці збільшують плідність самок, або в гермафродитних організмах, де функція самця потребує менше інвестицій, ніж функція самки (Avisé, 2008; Schön et al., 2009). Крім того, у видів, де самки чергують клонове та статеве розмноження, перевага може бути не повністю реалізована (Alves et al., 1998, 2001; Christiansen, Reyer, 2009; Dedukh et al., 2023). Навіть якщо ці умови не виконуються, повна користь може бути не реалізована через недостатньо ефективні цитогенетичні механізми, які використовуються клонами, щоб уникнути зниження плідності під час гаметогенезу (Mikulíček et al., 2014; Dedukh et al., 2023).

Крім того, було показано, що до змін гаметогенезу здатні лише 2-5% зародкових клітин, які можуть почати і закінчити мейоз і сформувати потомство, в той час як усі інші клітини гинуть під час гаметогенезу (Shimizu et al., 2000; Newton et al., 2016; Dedukh et al., 2022). Це може призвести до зниження плодючості клонів. Незважаючи на це, навіть скромна демографічна перевага клонів може забезпечити їм потужну короткострокову перевагу, яка повинна бути врівноважена перевагами статевого розмноження (Stöck et al., 2012). Статеве розмноження також спричиняє короткострокові витрати, такі як витрати на виробництво самців і інтерлокусний статевий конфлікт, коли самці розвивають риси, які знижують плідність самок. Ці витрати можуть досягати 22% зниження плодючості протягом життя у деяких видів (Schön et al., 2009; Stöck et al., 2021). Клонове відтворення також має дві основні довгострокові переваги. Перша перевага стосується того, що егоїстичні елементи можуть накладати значне генетичне навантаження на статеві лінії, якого немає в клонових лініях (Schön et al., 2009; Janko et al., 2023). Друга перевага стосується того, що внутрішньолокусний статевий конфлікт через статево антагоністичні алелі може створити додаткове навантаження у статевих видів, що знижує їхній чистий коефіцієнт розмноження. Це навантаження відсутнє в повністю жіночих клонових лініях, які походять від статевих предків (Schön et al., 2009; Janko et al., 2023).

Хоча існують деякі короткострокові переваги статевого розмноження, такі як стійкість до певних патогенів і передача патогенів від батьків до нащадків, більшість генетичних переваг виникають протягом більш тривалого періоду часу (Van Valen 1973; Bell 1982; Janko, 2014; Janko et al., 2023). Клонове розмноження має два довгострокові недоліки. Перший недолік викликаний тим, що більш високе мутаційне навантаження може накопичуватися з часом. Це відбувається лише тоді, коли існують спільні епістатичні взаємодії між мутаціями в різних локусах (Johnson, Howard, 2007; Schön et al., 2009; Neiman et al., 2010; Henry, Schwander, Crespi, 2012; Stöck et

al., 2021). І другий недолік пов'язаний із тим, що нові мутації потрапляють у пастку свого початкового генетичного фону, що впливає на природний відбір (Schön et al., 2009; Henry, Schwander, Crespi, 2012). Одним із прикладів цього в клональних популяціях є храповий процес Мюллера, який пояснює накопичення помірно шкідливих мутацій (Leslie, Vrijenhoek, 1980; Howe, Denver, 2008).

Інший спосіб, у якому фонове захоплення впливає на клонові популяції, полягає в тому, що корисні мутації, як правило, виникають у генетичному фоні з низьким рівнем придатності, що призводить до їх видалення з генофонду шляхом природного відбору (Kondrashov, 1988; Lively et al., 1990). Навпаки, статеві популяції дозволяють тим самим мутаціям уникнути свого початкового генетичного набору з низькою пристосованістю, що призводить до більшої ймовірності фіксації (Kondrashov, 1988; Lively et al., 1990). Ця підвищена ефективність у фіксуванні корисних мутацій у статевих популяціях призводить до швидшої адаптивної еволюції та є генетичною основою для процесу Червоної Королеви та більшої генетичної різноманітності статевих ліній (Hamilton, 1980; Kondrashov, 1988). Однак можливі ситуації, які також можуть призвести до вимирання під час адаптивної еволюції - коли корисні мутації в клональних лініях тягнуть за собою помірно шкідливі мутації в їхньому генетичному фоні, що призводить до регресивної еволюції в інших локусах того самого генома (Johnson, Howard, 2007; Schön et al., 2009; Neiman et al., 2010; Henry, Schwander, Crespi, 2012).

Для усунення цих явищ у клоновій популяції дві різні корисні мутації повинні виникнути послідовно в одній лінії, щоб стати фіксованими, тоді як у статевій популяції ці самі мутації можуть стати фіксованими набагато швидше, оскільки вони можуть зустрічатися разом в одному геномі через сингамію (Neiman et al., 2010; Henry, Schwander, Crespi, 2012; Kočí et al., 2020). Також, якщо дві корисні мутації виникають у різних клонових лініях і

кожна має однакову пристосованість, швидкість накопичення обох мутацій сповільниться через конкуренцію з іншим клоном, процес, відомий як клональна інтерференція (Orive, Krueger-Hadfield, 2021). Хоча можуть бути додаткові переваги статі, які не були виявлені, існуючі витрати та переваги, ймовірно, вичерпні.

1.2 Різноманіття типів відтворення у гібридів

Клональне розмноження зазвичай пов'язане з гібридизацією у більшості тварин та рослин. Окрім того, клональне розмноження у хребетних завжди (можливо, за винятком спонтанного клонального розмноження у деяких видів риб, плазунів та птахів) виникає у результаті гібридизації (Joly, 2001; Som, Bagheri, Reyer, 2007). Гібридизація може відбуватися як в статевих, так і в нестатевих популяціях і передбачає поєднання генетичного матеріалу двох різних організмів (Stöck et al., 2021). При статевому розмноженні гібридизація може призвести до створення нащадків з унікальними генетичними рисами та характеристиками. При нестатевому розмноженні гібридизація може ввести генетичне різноманіття в клонові популяції, що може збільшити їхній адаптивний потенціал і зменшити їхню вразливість.

Гібридизація при нестатевому розмноженні є відносно рідкісним явищем, оскільки вимагає злиття генетичного матеріалу двох різних організмів, які розмножуються безстатевим шляхом (Schardl, Craven, 2003; Goulet, Roda, Hopkins, 2017; Steensels, 2021). Однак гібридизація може відбуватися в деяких організмів, які розмножуються безстатевим шляхом, наприклад у рослин (Goulet, Roda, Hopkins, 2017; Jiang, 2019) і грибів (Schardl, Craven, 2003; Steensels, 2021). У рослин гібридизація може відбуватися шляхом злиття соматичних клітин, що призводить до створення потомства з унікальними генетичними ознаками (Goulet, Roda, Hopkins, 2017; Jiang, 2019). У грибів гібридизація може відбуватися шляхом злиття гіф, що

може призвести до створення потомства з унікальними комбінаціями генетичного матеріалу (Schardl, Craven, 2003; Steensels, 2021).

Гібридизація при статевому розмноженні - це процес поєднання генетичного матеріалу від двох різних батьків. Це може призвести до створення потомства з унікальними генетичними рисами та характеристиками (Mallet, 2010; Abbott et al., 2013). Гібридизація є важливим механізмом еволюції, оскільки вона може призвести як до формування пре-та постзиготичних бар'єрів між вже ізольованими видами, так і до створення нових видів (Zong, Fan, 1989; Bullini, 1994; Ishishita et al., 2015; Torgasheva et al., 2016; Lavanchy, Schwander, 2019; Dedukh et al., 2020).

Гібриди є нащадками двох різних видів, і вони можуть мати генетичний матеріал від обох батьків. У гібридних організмів, які виникли в результаті схрещування особин, які розмножуються статевим шляхом, мейоз може бути ускладнений наявністю двох різних батьківських геномів (Arnold, Hodges, 1995; Rieseberg, 2001; Coyne, Orr, 2004; Mallet, 2010; Abbott et al., 2013). Під час мейозу гомологічні хромосоми з'єднуються в пари й обмінюються генетичним матеріалом у процесі кросинговеру, що призводить до створення нових генетичних комбінацій і фенотипових ознак. Однак, у гібридних організмах гомологічні хромосоми можуть неправильно утворювати пари через відмінності в батьківських геномах (McKee, 2004). Це може призвести до мейотичних аномалій, що в свою чергу може призвести до зниження фертильності або навіть стерильності гібридного потомства, а це в свою чергу до втрати гібридних популяцій. Наявність негомологічних асоціацій хромосом або непарних хромосом може призвести до утворення нефункціональних гамет, що може знизити фертильність і обмежити генетичну різноманітність нащадків (Arnold, Hodges, 1995; Rieseberg, 2001; Coyne, Orr, 2004).

У тих випадках, коли генетична дивергенція і хромосомні відмінності між видами, які схрещуються, є незначними, то у гібрида стає можливим

проходження мейозу і формування фертильних гамет. В таких випадках гібрид виробляє гамети, які містять унікальну комбінацію генетичного матеріалу обох батьківських видів. Гамети гібридів містять генетичний матеріал двох різних видів, що може збільшити генетичне різноманіття потомства (Mallet, 2010; Abbott et al., 2013). А це в свою чергу може підвищити здатність нащадків адаптуватися до мінливого середовища та підвищити їхні шанси на виживання.

Якщо у гібридних організмів між хромосомами різних видів все ж відбудеться кон'югація, то це може призвести до інтрогресії генів від одного виду до іншого, не обов'язково спричиняючи утворення нової гібридної лінії. Цей процес, відомий як гібридизація та інтрогресія, може відігравати важливу роль в адаптивній еволюції та може призвести до передачі корисних ознак від одного виду до іншого (Rhymer, Simberloff, 1996; Dowling, Secor, 1997).

В деяких випадках, гібридизація та інтрогресія можуть призвести до злиття цілих геномів батьківського виду, що призведе до утворення нового гібридного виду з новим генетичним складом. Цей тип гібридизації відомий як гомоплоїдне гібридне видоутворення і був задокументований у кількох таксонах тварин, включаючи птахів і ссавців (Mallet, 2007; Abbott et al., 2010).

Ще одним способом відтворення міжвидових гібридів є зміна гаметогенезу в бік клонального або напівклонального розмноження (Bogart, Dawley, 1989; Schön et al., 2009; Neaves, Baumann, 2011; Stöck et al., 2021). Такий спосіб відтворення відбувається при певному ступені дивергенції батьківських видів, коли з одного боку гомологічні хромосоми не здатні до формування бівалентів, але з іншого боку поєднання геномних наборів батьківських видів не приводить до зниження життєздатності гібридів (Janko et al., 2018; Stöck et al., 2021; Marta et al., 2023). Існує декілька типів

клонального або напівклонального відтворення у міжвидових гібридів хребетних:

Партеногенез – тип відтворення, який дозволяє самкам породжувати потомство безстатевим шляхом, обходячи вимогу чоловічого запліднення та створюючи генетично однакове потомство (Cuellar, 1971; Lutes et al., 2010; Neaves, Baumann, 2011; Spangenberg et al., 2020; Stöck et al., 2021). Механізми партеногенезу включають пригнічення мейозу, коли материнський геном дублюється без звичайного зменшення кількості хромосом (Cuellar, 1971; Lutes et al., 2010; Spangenberg et al., 2020). Це часто супроводжується або апоміксисом, коли ембріони розвиваються безпосередньо з незапліднених яєць (Spangenberg et al., 2020), або автоміксисом, де подвоєння або злиття гамет або клітин зародкової лінії перед мейозом, призводять до генетичної варіації серед нащадків (Cuellar, 1971; Stenberg, Saura, 2009; Van Dijk, 2009; Lutes et al., 2010). Молекулярні та клітинні процеси, відповідальні за початок ембріонального розвитку за відсутності запліднення, залишаються активною сферою наукових досліджень.

Іншим типом клонального відтворення є андрогенез, який є формою нестатевого розмноження, при якому геном матері передається нащадкам в яйцеклітині, але не використовується для нормального розвитку (McKone, Halpern, 2003; Schwander, Oldroyd, 2016). Замість цього він вибірково усувається або замовчується, тоді як батьківський геном дублюється для отримання диплоїдного потомства (Komen, Thorgaard, 2007). Результатом цього процесу є клональна лінія, яка походить від батьківського геному, але з деяким генетичним внеском від матері. Андрогенез рідко зустрічається в природі, але він був виявлений у деяких видів риб (McKone, Halpern, 2003; Komen, Thorgaard, 2007). У деяких випадках андрогенне потомство може бути життєздатним і відтворюватися, що призводить до формування чистих андрогенних ліній (Seguí-Simarro, 2016).

Гіногенез є ще одним тип відтворення, де сперматозоїди чоловічого батьківського виду використовуються для активації яйцеклітини жіночого батьківського виду, але геном сперматозоїда не інтегрується в геном нащадка (Hubbs, Hubbs, 1932; Monaco et al., 1984; Bohlen, Rab, 2001; Schön et al., 2009; Juchno et al., 2016; Dedukh et al., 2020). Натомість нащадки успадковують повний набір хромосом від батьківського виду жіночої статі, без генетичного внеску чоловічого виду батьківського походження за рахунок того, що геном яйцеклітини ідентичний геному матері. Чоловічий геном діє лише як тригер для активації яйцеклітини, а потім деградує. Як наслідок, гіногенетичні нащадки по суті є клонами материнського виду, але можуть демонструвати деякі фенотипові варіації через фактори середовища або епігенетичні модифікації. Гіногенез відносно рідкісний у природі, але повідомлялося про деякі види риб, які відтворюються шляхом гіногенезу (Hubbs, Hubbs, 1932; Monaco et al., 1984; Bohlen, Rab, 2001; Juchno et al., 2016; Dedukh et al., 2020). Він подібний до партеногенезу механізмом формування яйцеклітин з геномом ідентичним геному батьківських соматичних клітин. Гіногенез є формою нестатевого розмноження, коли потомство розвивається з незапліднених яєць, але з додатковою особливістю, яка вимагає сперматозоїдів для активації розвитку яйця (Lamatsch, Stöck, 2009; Zhang et al., 2015).

Клептогенез — репродуктивна стратегія, яка спостерігається у кількох гібридних форм роду *Ambystoma* (MacGregor, Uzzell, 1964; Bi, Bogart, 2010). Це явище передбачає зміни у репродуктивних процесах, коли самки утворюють яйцеклітини з геномом, який ідентичний геному соматичних клітин. Так само як і у випадку партено- та гіногенеза, самки, спаровуючись із самцями близькоспорідненого виду, потім вибірково зберігають генетичний матеріал від самця, при цьому відкидаючи свій відповідний генетичний матеріал (MacGregor, Uzzell, 1964; Bogart et al., 2007). Цей незвичайний механізм призводить до появи потомства з мозаїкою генетичних

ознак, успадкованих від обох батьківських видів (MacGregor, Uzzell, 1964; Bi, Bogart, 2010). Тонкощі клептогенезу, такі як точні механізми, що керують генетичним збереженням і елімінацією, залишаються областю активних досліджень. Це явище служить багатою платформою для вивчення еволюційного значення генетичних взаємодій, меж видів і репродуктивних адаптацій.

Гібридогенез — це процес, коли тільки один із батьківських геномів передається наступному поколінню без змін, а інший відкидається (Schultz, 1967; Cimino, 1972; Tunner, 1973; Tunner, Heppich, 1981; Heppich, Tunner, Greilhuber, 1982; Christiansen et al., 2005; Dedukh et al., 2020). При цьому гібриди виникають у результаті схрещування з тим батьківським видом, геном якого видаляється. Цей унікальний спосіб розмноження було задокументовано в різних таксонах тварин, включаючи риб (Schultz, 1967; Cimino, 1972; Kimura-Kawaguchi et al., 2014; Majtánová et al., 2021), амфібій (Tunner, 1973; Tunner, Heppich, 1981) і паличників (Mantovani, Scali, 1992). Незважаючи на розповсюдженість, механізми, що лежать в основі гібридогенезу, залишаються недостатньо вивченими, і багато аспектів цього процесу все ще є предметом дискусій.

Вважається, що міжвидові гібриди, які розмножуються клонально, із часом стикаються із тим, що через відсутню рекомбінацію між геномами, гібриди мають знижену фертильність та життєздатність. Одним із механізмів подолання цього є процес поліплоїдизації. Спонтанне формування поліплоїдів у тварин відбувається рідше, ніж у рослин і часто пов'язане з клональним розмноженням (Günther, 1983; Christiansen et al., 2005). Це пов'язано перш за все з тим, що в ході змін гаметогенезу, гібридні тварини утворюють диплоїдні гамети. В результаті запліднення таких гамет виникають аллополіплоїдні (триплоїдні або тетраплоїдні) особини. Аллополіплоїдія передбачає злиття цілих геномів різних батьківських видів, у результаті чого утворюється гібрид із кількома копіями кожної хромосоми.

Отриманий гібрид може бути стерильним або мати знижену фертильність, але в деяких випадках він може дати початок новому аллополіплоїдному виду, який може розмножуватися нестатевим або статевим шляхом з іншими представниками того самого виду (Marta et al., 2023; Dedukh et al., 2023). Такі гібриди зазвичай мають такий самий спосіб відтворення, як і їх диплоїдні батьки-попередники, проте, у деяких випадках здатні змінювати свої шляхи гаметогенезу (Alves et al., 1998; Christiansen, Reyer, 2009; Dedukh et al., 2023). Ці зміни включають видалення геному, який є лише у одній копії, тоді як ті геноми, що лишилися, рекомбінують і в ході мейозу утворюють гаплоїдні гамети (Alves et al., 1998; Christiansen, Reyer, 2009; Dedukh et al., 2023). У випадку триплоїдного гібридогенезу, особини переходять від клонального способу розмноження до статевого, що дозволяє відбутися рекомбінації між гомоспецифічними геномами, забезпечуючи таким чином різноманіття гамет (Christiansen et al., 2005; Christiansen, Reyer, 2009; Alves et al., 1998, 2001; Marta et al., 2023). Для формування тетраплоїдних особин потрібні дві диплоїдні гамети, або одна триплоїдна і одна гаплоїдна гамети від різних батьків, це в свою чергу призводить до виникнення симетричних тетраплоїдів. Саме у них процес мейозу призводить до формування редукованих гамет і, таким чином, відбувається повернення до статевого розмноження. Однак для підтримки таких тварин в популяціях необхідна велика кількість тетраплоїдних тварин, які можуть в подальшому утворюватися від схрещувань один з одним, а також, знаходження нової ніші існування, яка є відмінною від тієї, де вони співмешкають з клональними гібридами та батьківськими видами. Отже, такі тетраплоїдні тварини можуть привести до виникнення нового виду.

Загалом, різноманітність механізмів гібридизації, яка супроводжується клональним відтворенням і поліплоїдизацією і зумовлює складність біологічних процесів і роль еволюції у створенні нових способів відтворення та генетичного різноманіття.

1.3 Цитогенетичні механізми відтворення

Мейоз має першочергове значення для статевого розмноження у хребетних, оскільки він призводить до створення генетичної різноманітності через рекомбінацію гомологічних хромосом і унікальний набір хромосом під час двох раундів поділу (Ohkura, 2015; Zickler, Kleckner, 2015).

Процес мейозу у хребетних є складним і включає низку етапів, які забезпечують правильну сегрегацію та розподіл хромосом. Ці етапи включають кон'югацію гомологічних хромосом, утворення хіазми, обмін ділянками материнських та батьківських хромосом і подальший поділ гомологічних хромосом під час першого поділу та поділ сестринських хроматид під час другого поділу. У результаті чого формуються гаплоїдні гамети (Ohkura, 2015; Zickler, Kleckner, 2015).

Профаза I: конденсація хромосом і гомологічна кон'югація (Subramanian, Hochwagen, 2014). Фаза профазы I складається із п'яти стадій. Під час *лептотени* (першої стадії профазы) хроматин всередині ядра починає конденсуватися, утворюючи довгі тонкі нитки, які представляють окремі нерепліковані хромосоми. Процесу конденсації сприяють різні білки, в тому числі гістони.

Під час другої стадії (*зиготени*), гомологічні хромосоми, які вже зазнали реплікації в попередній інтерфазі, починають вирівнюватись і зближуватись одна з одною (синапс). Спеціалізовані білки, такі як синаптонемальний комплекс, полегшують цей процес та забезпечують точне вирівнювання між гомологічними хромосомами. Синапс утворює структуру, звану бівалентом або тетрадою, що складається з двох гомологічних хромосом, кожна з яких складається з двох сестринських хроматид.

Під час *пахітени* (третьої стадії) гомологічні хромосоми всередині бівалентів продовжують вирівнюватись, і відбувається генетична рекомбінація, в ході якої відбувається обмін генетичним матеріалом між

хроматидами гомологічних хромосом. Цей процес призводить до перемішування алелів і створення унікальних генетичних комбінацій.

Під час *диплотени* (четвертої стадії) синаптонемальний комплекс, який утримував гомологічні хромосоми разом руйнується, а гомологічні хромосоми починають відштовхуватися одна від одної, але залишаються з'єднаними в місцях перехрещення (хіазми). Біваленти набувають виду окремих пар гомологічних хромосом.

На останній стадії (*діакінез*) хромосоми досягають максимальної конденсації. Ядерна оболонка починає розпадатися, і починає формуватися веретено поділу. Діакінез створює основу для наступної фази.

Метафаза I: хромосомне вирівнювання та прикріплення волокон веретена (Nasmyth, 2001). Метафаза I - процес вирівнювання бівалентів, які складаються із гомологічних пар хромосом уздовж екваторіальної площини клітини. Веретеноподібні волокна, динамічні мікротрубоччасті структури, приєднуючись до центромерних ділянок гомологічних хромосом, готують їх до поділу на наступній стадії.

Анафаза I: гомологічна сегрегація хромосом (Craig, Choo, 2005). Узгоджена дія волокон веретена, що скорочуються з точністю, служить для поділу гомологічних пар хромосом, які мігрують до протилежних клітинних полюсів, утворюючи дві гаплоїдні дочірні клітини, кожна з яких має окремий хромосомний набір, з унікальним геномом.

Телофаза I і цитокінез (Ohkura, 2015; Zickler, Kleckner, 2015). Після анафази I настає телофаза I, яка характеризується деконденсацією хромосом, що часто супроводжується реформуванням ядерної оболонки. Кінцева фаза цитокінезу завершується розділенням клітини, що дає початок двом окремим гаплоїдним дочірнім клітинам.

Мейоз II: Подальша редукція хромосом (Ohkura, 2015; Zickler, Kleckner, 2015). Мейоз II – по-суті, є повторенням мейозу I без фази реплікації ДНК, точно відображає мітоз, хоча і в гаплоїдних клітинах.

Профаза II, метафаза II, анафаза II і телофаза II: утворення гаплоїдної гамети (Ohkura, 2015; Zickler, Kleckner, 2015). Ці фази мейозу II відбуваються в гаплоїдних клітинах і концептуально схожі на їхні аналоги мейозу I. Сестринські хроматиди, які досі були зв'язані центромерними структурами, розходяться до різних полюсів, хромосоми деспіралізуються, веретено поділу зникає і у результаті формуються чотири гаплоїдні гамети.

Збереження хромосомної цілісності відіграє критичну роль у забезпеченні точної передачі генетичної інформації від одного покоління до наступного. Хромосомні перебудови включають зміни в структурі хромосом, такі як транслокації або інверсії, які можуть порушити нормальне функціонування генів (напр. Schartl, 2004). Ці перебудови не завжди можуть призводити до видимих фізичних аномалій, але все ж можуть спричинити безпліддя, якщо вони заважають репродуктивним процесам, таким як формування гамет або розвиток ембріона.

Підсумовуючи, цитогенетичні механізми розмноження у хребетних є складними та вирішальними для створення та підтримки генетичного різноманіття в популяціях. Майбутні дослідження повинні бути спрямовані на краще розуміння молекулярних механізмів, які керують цими процесами, а також факторів, які сприяють генетичним аномаліям і втраті генетичного різноманіття.

1.4 Особливості розмноження гібридів. Елімінація, ендореплікація

У міжвидових гібридів, які розмножуються переважно клонально або напівклонально, відбуваються зміни у гаметогенезі до чи під час мейозу, а також під час запліднення. Ці зміни частіше за все включають елімінацію (видалення) генетичного матеріалу від одного із батьків (Dedukh, Krasikova, 2022). Детальні механізми цього процесу все ще залишаються недостатньо вивченими. Цитологічний аналіз видалення генетичного матеріалу проводився лише для окремих видів гібридів (Dawley, Bogart, 1989; Schön et

al., 2009; Wang, Davis, 2014; Dedukh, Krasikova, 2022). Видалення геному одного з батьківських видів із клітин гібрида може відбуватися майже одразу після запліднення (наприклад, амбістоми, молюски роду *Corbicula*, *Carassius gibelio*), під час мітотичного поділу в клітинах зародкової лінії (гібриди зеленої жаби *Pelophylax esculentus*, риби роду *Poeciliopsis*, *Cobitis*), або під час мейозу (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Cimino, 1972; Tunner, Heppich, 1981; Komaru et al., 1998; Bogart et al., 2007; Morishima et al., 2008; Stöck et al., 2012; Zhang et al., 2015; Dedukh et al., 2020, 2023). У гібридних риб з роду *Poeciliopsis* (Schultz, 1967, 1969) і в'юна *Misgurnus anguillicaudatus* (Morishima et al., 2008) було помічено, що видалення геному одного з батьківських видів відбувається під час мітозу або мейозу. Це явище пов'язане з нездатністю хромосом одного з батьківських видів прикріплюватися до веретена поділу. У гібридів роду *Poeciliopsis* у клітинах зародкової лінії утворюється уніполярне веретено, до якого прикріплюються лише материнські хромосоми, тоді як батьківські хромосоми залишаються в цитоплазмі (Cimino, 1972). Нездатність хромосом прикріпитися до мікротрубочок призводить до затримки хромосом одного з батьківських видів під час анафази і їх подальшої дегенерації (Cimino, 1972; Dedukh et al., 2022). Вважається, що це порушення прикріплення виникає через відмінності в центромерних послідовностях між двома батьківськими видами.

Bogart et al. (1989) показали, що для амбістоми видалення або збереження геному залежить від температури. Якщо запліднення і розвиток відбувалися за високих температур (+15 °C), випадки збереження геному в потомстві значно збільшувалися, тоді як за більш низьких температур геном елімінувався. Аналогічно, елімінація геному залежить від температури у міжвидових гібридів рослин (Ahmadli et al., 2023). Одним із найскладніших і найменш зрозумілих процесів є видалення одного батьківського геному у представників *Pelophylax esculentus* complex (Tunner, Heppich, 1981; Vucchi et al., 1990; Tunner, Heppich-Tunner, 1991, 1992; Ogielska 1994; Межжерин,

Морозов-Леонов, 1994; Reyer et al., 2015; Dedukh et al., 2015, 2017; Morozov-Leonov, 2017, 2021a, б, 2023 Dedukh, Krasikova, 2022). Цікаво, що на відміну від більшості інших гібридних тварин, гібриди *P. esculentus* містять як чоловічих, так і жіночих особин (Dufresnes, Mazera, 2020). Завдяки порівнянню мінливості алозимних спектрів у самок *P. esculentus*, а також завдяки аналізу геногенетичного потомства шляхом проточної ДНК цитометрії було показано, що ці самки передають виключно геном одного батьківського виду без рекомбінації (Uzzell et al., 1975, 1977, 1980; Graf, Mueller, 1979; Reyer et al., 2015). Подальші дослідження показали, що в диплоїдних *P. esculentus* різної статі із клітин зародкової лінії ще до мейозу елімінується геном одного з батьківських видів, а інший – дуплікується (Tunmer, Heppich, 1981; Vucchi et al., 1990; Tunmer, Heppich-Tunmer, 1991, 1992; Межжерин, Морозов-Леонов, 1994а, б; Reyer et al., 2015; Dedukh et al., 2015, 2017; Morozov-Leonov, 2017, 2021a, б, 2023). Це явище спостерігається у диплоїдних і триплоїдних гібридів (Ogielska, 1994; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2019, 2020). Пілотні дослідження елімінації геному у гібридів зеленої жаби (аналіз гаметогенезу у дорослих самців та самок, а також, прегаметогенезу у гібридних пуголовків) показали, що видалення одного батьківського набору генів відбувається до метаморфозу і відсутнє у дорослих тварин (Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020). На відміну від гібридних генетичних форм *Poeciliopsis*, особини *P. esculentus* не демонструють утворення уніполярного веретена поділу. Це дозволило висунути гіпотезу про те, що видалення одного з батьківських геномів відбувається під час мітозу як наслідок поступової затримки хромосом від одного з батьківських видів (Ogielska, 1994; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020).

За допомогою каріотипування клітин гонад пуголовка та аналізу морфології гонад були виявлені численні анеуплоїдні клітини та затримка окремих хромосом у процесі елімінації (Chmielewska et al., 2018; Dedukh et

al., 2020). Дослідники припускають, що аналогічно до процесів елімінації геному у рослин, поступове видалення хромосом може бути результатом відмінної активності центромер двох батьківських видів під час мітозу зародкових клітин (Sanei et al., 2011; Wang, Davis, 2014; Ishii et al., 2016). Функція центромери може залежати від кількості копії центромерного повтору, яка відрізняється у *P. ridibundus* і *P. lessonae* (Ragghianti et al., 1995, 2007; Maracci et al., 2011). Згідно з цією теорією, селективне успадкування хромосом *P. ridibundus* пояснюється більшою кількістю повторів у центромері, що посилює їх прикріплення до веретена поділу порівняно з хромосомами *P. lessonae*. Однак інша гіпотеза, запропонована Огельською (1994), передбачає, що “відключення” батьківського геному під час раннього гаметогенезу *P. esculentus* може відбуватися через «брунькування» хроматину в інтерфазі. Ця ідея виникла після ідентифікації мікроядер у цитоплазмі зародкових клітин гонад пуголовків під час інтерфази (Chmielewska et al., 2018). Мікроядра зустрічаються тільки у гібридних жаб і з'являються від початку статевої диференціації гонад до початку метаморфозу (Dedukh et al., 2017, 2020; Chmielewska et al., 2018, 2022). Вони відсутні в недиференційованих гонадах (25-27 стадія розвитку за Госнером), а також на більш пізніх етапах розвитку (після метаморфозу) (Chmielewska et al., 2018, 2022). Автори додатково зареєстрували відставання хромосом під час мітозу, пов'язуючи це із процесом утворення мікроядер (Chmielewska et al., 2018). Унікальним аспектом процесу елімінації у клітинах зелених жаб є те, що розпізнавання статевого генома не відбувається, на відміну від інших гібридних організмів. Передбачається, що елімінація відбувається рано, лише в клітинах зародкової лінії, оскільки соматичні клітини зберігають геноми обох батьківських видів (Chmielewska et al., 2018).

У триплоїдних гібридів в клітинах зародкової лінії, як правило, елімінується той геном, який перебуває у меншості, тобто у LLR особин видаляється R-геном і навпаки, у LRR особин видаляється L-геном (Graf,

Polls-Pelaz, 1989). Проте, трапляються і виключення (Plötner, 2005; Dedukh et al., 2015, 2017; Viriuk et al., 2016; Chmielewska et al., 2022). Незважаючи на обширні дослідження, частота та способи елімінації у диплоїдних і триплоїдних *P. esculentus*, а також процес «вибору» геному для елімінації у гетерозиготних гібридів залишаються значною мірою не досліджені.

Клітини з геномом, який залишився проходять мейоз і формують нормальні гаплоїдні гамети. Причиною поліплоїдизації є те, що за відсутності елімінації і наявності ендореplikації відбувається збільшення плоїдності до мейозу. При цьому, мейоз проходить канонічно за рахунок кон'югації між двома дуплікованими копіями хромосом, і це призводить до появи нередукованих диплоїдних гамет (Christiansen, 2009; Pruvost et al., 2013, 2015). Висока частка поліплоїдних особин у популяції означає, що між батьківськими видами, гамети яких дають гібридне потомство, велика генетична відстань (Christiansen, 2009; Christiansen et al., 2010). Наявність тетраплоїдних особин в таких популяціях дає можливість відновлення нормального перебігу мейозу, встановлюючи репродуктивний бар'єр між нововиниклими і батьківськими видами (Christiansen, 2009; Pruvost et al., 2013, 2015). Явище масової поліплоїдії серед популяційних систем зелених жаб вважається початковим етапом поліплоїдного видоутворення і привертає увагу багатьох дослідників.

1.5 Жаби роду *Pelophylax*, як модельний об'єкт вивчення гібридогенезу

Гібридогенез – одна з модифікацій гаметогенезу, яка дозволяє відтворення деяких міжвидових диплоїдних та поліплоїдних гібридів (Dawley, Vogart, 1989). Це відбувається завдяки елімінації одного з батьківських геномів з клітин зародкової лінії гібрида, в той час як інший геном передається у гаметах (Schultz, 1967; Cimino, 1972; Tunner, 1973; Tunner, Heppich, 1981; Tunner, Heppich-Tunner, 1991; Heppich, Tunner, Greilhuber, 1982; Christiansen et al., 2005; Chmielewska et al., 2018; Dedukh et

al., 2020). Елімінація зазвичай супроводжується подвоєнням геному, який лишився, що дозволяє відбутися мейозу. Однак, утворені гамети є клональними, оскільки кросинговер, який відбувається між двома генетично ідентичними подвоєними хроматидами, не призводить до рекомбінації (Choleva, Janko, 2013; Stöck et al., 2021). З цієї причини, гібридогенез часто описується як асексуальне відтворення. Цей специфічний процес виник у різних таксонів тварин незалежно (комахи, риби, амфібії) (Lavanchy, Schwander, 2020). Хоча гібридогенез може відбуватися в різних таксонах тварин, він був особливо добре вивчений у деяких видів жаб роду *Pelophylax*. Зелені жаби *Pelophylax* широко поширені в Європі та Азії та мають складну репродуктивну систему, яка передбачає гібридизацію між кількома близькоспорідними видами (Graf, Polls-Pelaz, 1989). У деяких випадках гібридизація може призвести до утворення гібридних генотипів, які не здатні виробляти власні життєздатні гамети, і натомість покладаються на спаровування з одним із батьківських видів для отримання нового гібридного потомства. Цей спосіб розмноження був задокументований у кількох гібридних лініях *Pelophylax* (*P. hispanicus*, *P. grafi*, *P. esculentus*), і він має важливі наслідки для розуміння еволюції цих видів та їх взаємодії між собою. У цьому контексті вивчення механізмів і наслідків гібридогенезу у жаб *Pelophylax* може дати розуміння процесів, які формують різноманітність популяцій земноводних і підтримку репродуктивних бар'єрів між видами.

Комплекс європейських зелених жаб роду *Pelophylax* складається з двох батьківських видів – *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (з генотипом LL) і *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (з генотипом RR), а також ди- та триплоїдних гібридів *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (з генотипами LR, LRR, LLR). Диплоїдні гібриди та батьківські види мають хромосомний набір, який складається із 26 хромосом ($2n=26$), триплоїди мають відповідно 39 хромосом ($3n=39$) (Heppich, 1978; Koref-Santibanez, 1979; Koref-Santibanez,

Günther, 1980; Alpagut, Falakali, 1995; Spasic-Boskovic et al., 1999; Shehri, Saleh, 2005; Alpagut et al., 2006; Сурядная, 2015; Манило и др., 2017).

Першовідкривач міжвидової гібридизації у жаб Бергер показав гібридну природу жаб за результатами схрещувань (Berger, 1968, 1970), а потім Тюннер за результатами алозимного аналізу запропонував гібридогенетичну природу відтворення *P. esculentus* (Tunner, 1973). Репродуктивний процес гібридогенезу у зелених жаб пов'язаний із отриманням повного незміненого геному від одного з батьків (Tunner, 1973; Tunner, Heppich, 1981; Tunner, Heppich-Tunner, 1991; Chmielewska et al., 2018; Doležalková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Цей механізм призводить до створення клональних нащадків, геном яких містить клональну (незмінену) і рекомбіновану (змінену) частини (Plötner, 2005; Doležalková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Бергер також встановив, що *P. esculentus* зазвичай мешкають і розмножуються разом з одним або обома їх батьківськими видами (Berger, 1968, 1970, 1973, 1977, 1983a; Graf, Polls-Pelaz, 1989). Ці сукупності не можна вважати типовими популяціями, і вони отримали назву популяційних систем (Шабанов, 2015; Shabanov et al., 2020).

Клональність у гібридів *Pelophylax* має значні наслідки адаптивності популяційних систем (Joly, 2001). Відсутність генетичного різноманіття в клонових популяціях може обмежити їх здатність адаптуватися до мінливих умов навколишнього середовища, роблячи їх більш сприйнятливими до хвороб і стресів (Plötner, 2005; Dufresnes, Mazera, 2020). Відсутність генетичної рекомбінації також може призвести до накопичення шкідливих мутацій, що в кінцевому підсумку впливає на пристосованість і виживання популяційних систем (Guex et al., 2002).

Незважаючи на ці проблеми, гібридогенез і клональність відіграють важливу роль в еволюції та збереженні гібридів *Pelophylax*. Гібридизація може призвести до формування нових генетичних ліній, тим самим сприяючи біорізноманіттю (Chan, Hoffmann, van Oppen, 2019). Крім того, оскільки

гібридогенез відбувається лише за певних умов і в певних популяційних системах, він може служити механізмом для підтримки генетичного різноманіття в цих самих системах.

Гібридогенез є вигідним для клонально передаваного геному, але він також може призвести до швидкої мутаційної деградації (Bove et al., 2014; Christiansen, 2005, 2009; Christiansen et al., 2005). Клональні популяції обмеженого розміру накопичують шкідливі мутації через храповик Мюллера (Guex et al., 2002; Som, Reyer, 2007; 2006a, b; Shabanov et al., 2020). У випадку гаплоїдії швидкість фіксації шкідливих алелів дорівнює швидкості накопичення, що призводить до того, що більшість мутацій з часом розподіляються між усіма особинами популяції (Som, Reyer, 2007; 2006a, b; Bove et al., 2014; Shabanov et al., 2020). Швидкість фіксації залежить від швидкості мутації, коефіцієнта відбору проти шкідливих алелів і розміру популяції. Вона не обов'язково вища для геномів, що передаються клонально, порівняно з гномами, що передаються статевим шляхом. Однак селекція проти шкідливих мутацій є слабкою в клональних геномах *P. ridibundus*, оскільки вони постійно захищені геномами *P. lessonae* у *P. esculentus*, що призводить до накопичення шкідливих мутацій (Guex et al., 2002; Som, Reyer, 2007; 2006a, b; Shabanov et al., 2020). Розмір популяції також має значення, а історія гібридної популяції відіграє вирішальну роль у накопиченні мутацій (Guex et al., 2002; Som, Reyer, 2007; 2006a, b). Навіть у великих популяціях зелених жаб кількість гібридів, що розмножуються, може бути обмеженою в деяких місцях (Dufresnes, Mazera, 2020).

Однією з цікавих можливостей є те, що статевий відбір може сприяти накопиченню мутацій у геномах, що передаються клонально. Показано, що самки *P. lessonae* віддають перевагу самцям свого виду, що важливо для стабільності системи L-E (Doležalková-Kašánková et al., 2022). Однак самці *P. lessonae*, здається, не відрізняються за цим параметром. Якщо геном *P. ridibundus*, що передається клонально, отримує мутацію втрати функції в

гені, яка впливає на розвиток самця, яким віддають перевагу самки *P. lessonae*, ця мутація може спричинити більш «подібний до *P. lessonae*» фенотип у самців *P. esculentus*, які є її носіями, збільшуючи їх шанси спаровуватися з самками їх «статевого господаря». Хоча такі мутації були б шкідливими на гомоспецифічному фоні, вони могли б бути корисними для гібридів навіть за умови позитивного відбору в популяційних системах (Gueh et al., 2002; Som, Reyer, 2007; 2006a, b; Shabanov et al., 2020; Doležalková-Kašánková et al., 2022).

1.6 Сперматогенез та диференціація гонад у зелених жаб

Процес сперматогенезу у представників *P. esculentus* complex поділяється на дві фази: пресперматогенез, який характерний для стадій пуголка та ранніх ювенільних стадій розвитку, та власне сперматогенез, який відбувається у статевозрілих самців (Ogielska, Bartmanska, 1999; Ogielska, 2009; Naczkiwicz et al., 2017). Пресперматогенез – процес проліферації первинних сперматогоній (унікальних клітин, які присутні у незрілих особин).

Стадія утворення сперматогоній (мітотична фаза): мітотична фаза є першою стадією сперматогенезу, на якій сперматогоніальні стовбурові клітини, розташовані в самому зовнішньому шарі сім'яних каналців, діляться шляхом мітозу, утворюючи більше сперматогоніїв (Ogielska, 2009). При цьому, у гібридних пуголок близько третини клітин є анеуплоїдними (Chmielewska et al., 2022). Це відбувається через те, що елімінація геному відбувається поступово шляхом відкидання кожної з хромосом видаляемого геному (Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020). До кінця цього процесу клітини лишаються анеуплоїдними. Потім, гоноцити диференціюються в первинні сперматоцити, які піддаються мейозу з утворенням гаплоїдних сперматид (Chmielewska et al., 2022).

Наступним етапом є активний сперматогенез, який поділяється на стадії утворення первинних і вторинних сперматогоній, сперматоцитів першого і другого порядків, сперматид і сперматозоїдів. Додатково, фаза сперматоцитів складається із стадій, які характерні для мейотичного поділу - лептотена, зиготена, пахітена, диплотена, діакінез (Rastogi et al., 1983; Naczkiwicz et al., 2017).

Стадія утворення сперматоцитів першого і другого порядків (мейотична фаза): мейотична фаза є другим етапом сперматогенезу. Первинні сперматоцити, які знаходяться у цистах, проходять два послідовних раунди мейозу для утворення гаплоїдних сперматид. При цьому, цей процес у кожній із цист є синхронізованим. Однак, у гібридів тільки $\frac{1}{3}$ від усіх клітин проходять мейоз, утворюючи сперматиди і сперматозоїди (Chmielewska et al., 2022). Під час мейозу I гомологічні хромосоми об'єднуються в пари (біваленти) та обмінюються генетичним матеріалом за допомогою процесу, який називається рекомбінацією або кросинговером. Це призводить до генетичної різноманітності потомства. Результатом мейозу I є дві гаплоїдні клітини, які називаються вторинними сперматоцитами (Ogielska, 2009). Під час мейозу II вторинні сперматоцити (хромосоми у вигляді унівалентів) знову діляться, утворюючи чотири гаплоїдні клітини, які називаються сперматидами. Було показано, що триплоїдні гібридні пуголки з геномом LRR мають трохи менший відсоток анеуплоїдних клітин у порівнянні з диплоїдними гібридами LR та триплоїдними гібридами LLR (Chmielewska et al., 2022).

Сперміогенез: Сперміогенез є завершальним етапом сперматогенезу, на якому сперматиди диференціюються в зрілі сперматозоїди (Ogielska, 2009). Під час сперміогенезу сперматиди зазнають серії морфологічних змін, щоб сформувати характерну форму сперматозоїда. Ці зміни включають утворення джгутика, подовження клітини, конденсацію ядра та утворення акросоми, яка містить ферменти, які допомагають злиттю оболонки

сперматозоїда з яйцеклітиною. Зрілі сперматозоїди вивільняються із цист і зберігаються у сім'яних канальцях. Chmielewska et al. (2022) також показали, що хоча диплоїдні та триплоїдні гібриди під час розвитку гонад мають варіабельний набір клітин із різними геномами (LL, RR, LR, RRRR, LLRR, L, R), у потомстві спостерігалися пуголки, які отримали від батька гаплоїдний ген R або L.

Різниці у розвитку гонад між *P. lessonae* та *P. ridibundus* не виявлено (Ogielska, Bartmanska, 1999). Однак, авторами було зазначено, що гібридні пуголки мали менші розміри гонад у порівнянні із батьківськими видами тих же стадій. Більше того, всередині вибірки гібридних пуголок тих самих стадій, гонади мали різну стадію диференціації. У порівнянні із батьківським видом, гібридні пуголки після метаморфозу все ще мали маленькі сім'яники і низьку кількість зрілих первинних сперматогоній та зародкових клітин. Після зимівлі більшість зародкових клітин у цистах сім'яників все ще були незрілими, проте, вже спостерігалися цисти із клітинами на різних стадіях мейозу. Хоча у дорослих особин *P. esculentus* сім'яники не відрізнялися ані за розмірами, ані за структурою від сім'яників зрілих особин батьківського виду, низка авторів зазначає, що сім'яники гібридних самців часто мають різну форму (видовжені, округлі, з вигинами тощо) (Ogielska, Bartmanska, 1999; Бірюк, 2017; Litvinchuk, 2018).

1.7 Типи популяційних систем зелених жаб

Гібриди зазвичай співіснують і розмножуються з одним або двома батьківськими видами, утворюючи популяційні системи (Graf, Polls-Pelaz, 1989). Популяційні системи, де мешкають представники *P. lessonae* і гібриди прийнято називати L-E, а ті, де з *P. ridibundus* – R-E, також зустрічаються чисті популяційні системи, де ди- та триплоїдні гібриди співмешкають та відтворюються (E-тип) та змішаного типу – L-E-R, у яких гібриди співмешкають з обома батьківськими видами (Graf, Polls-Pelaz, 1989). Кожна

із таких систем має свої особливості відтворення та за рахунок цього свій еволюційний потенціал. Різноманіття типів систем викликане тим, що батьківські види та / або гібриди, схрещуючись між собою, підтримують чисельність на постійному рівні довгий час. Також, гамети, які виробляють гібриди, пов'язані з характером популяційних систем, в яких вони мешкають (Graf, Polls-Pelaz, 1989). Геміклональне відтворення призводить до того, що генофонд популяційної системи складається з рекомбінантних геномів і сукупностей клональних ліній (Graf, Polls-Pelaz, 1989; Christiansen, 2005, 2009; Plötner, 2009). Особини, які виникають від схрещування гібрида з батьківським видом передають нащадкам ідентичну спадкову інформацію. Те, який з геномів буде передаватись як клональний – достеменно невідомо.

Системи L-E зустрічаються в центральній Європі та на території росії (Rybacki, Berger, 1994, 2001; Reyer et al., 2004; Pruvost et al., 2015, 2013b; Межжерин и др., 2007; Mayer et al., 2013; Krizmanic, Ivanovic, 2010; Hotz et al., 2001, 2008, 1992; 1978; Hoffmann, Reyer, 2013; Hoffmann et al., 2015; Günther, 1975; Gubanyi, 1995; Gubanyi, Creemers, 1994; Gubanyi, Pekli, 1991; Gubanyi, Korsos, 1992, 1994; Daf et al., 2006; Berger, Günther, 1988; Blankenhorn, 1976; Zavadil, 1994; Hermaniuk et al., 2020; Dubey et al., 2019). Цей тип систем є найрозповсюдженішим. До 95% гібридів можуть населяти такі популяційні системи, причому частка триплоїдних гібридів в них доволі висока. Відтворення в таких системах відбувається завдяки тому, що майже всі диплоїдні гібриди (як самці, так і самки) формують гамети *P. ridibundus*, після успішного видалення геному *P. lessonae*. Додатково, гібридологічним методом та методом проточної ДНК цитометрії була показана наявність самців, які продукують диплоїдні гамети з геномом LL, LR, RR (Berger, 1988; Berger, Günther, 1988; Vucci et al., 1990; Tunner, 1991; Mikulíček, Kotlik, 2001; Pruvost et al., 2013, 2015). Такі гамети роблять можливим виникнення триплоїдів у таких популяційних системах. Також, за допомогою аналізу хромосом типу лампових щіток, а також гібридологічним методом показана

можливість продукування диплоїдних гамет гібридними диплоїдними самками із деяких L-E систем, проте їх потомство зазвичай нежиттєздатне, оскільки в таких популяційних системах немає триплоїдів (Dedukh et al., 2019).

Системи змішаного типу L-E-R зустрічаються рідко і вивчені дуже мало. Такі системи були точково знайдені на території Німеччини, Нідерландів, України із більш високою вірогідністю зустрічальності в Східній Європі (Hoffmann, Reyer, 2013; Rybacki, Berger, 1994, 2001; Reyer et al., 2004; Pruvost et al., 2015, 2013b; Hotz et al., 2001, 2008, 1992; 1978; Hoffmann, Reyer, 2013; Hoffmann et al., 2015; Daf et al., 2006; Berger, Günther, 1988; Krizmanic, Ivanovic, 2010; Межжерин, Морозов-Леонов, 1996; Polls-Pelaz, 1994; Pruvost et al., 2015; Sas et al., 2010; Spasic-Boskovic et al., 1999; Zavadil, 1994; Hermaniuk et al., 2020; Zalesna et al., 2011; Cavlovic et al., 2018; Suriadna et al., 2020; Dedukh et al., 2019, 2020; Chmielewska et al., 2018, 2022). Вважається, що ці системи є тимчасовими, оскільки в них відбувається витіснення одного із батьківських видів гібридами (Plötner, 2005). Завдяки аналізу хромосом типу лампових щіток, було показано, що самиці в таких системах можуть продукувати життєздатні гамети із геномом *P. ridibundus*, а також гамети із різним складом геному, проте такі гамети не дають життєздатного потомства (Dedukh et al., 2019). У нещодавніх дослідженнях гаметогенезу самців із L-E-R систем Польщі було показано, що гібридні самці із таких популяційних систем переважно продукують гамети із геномом *P. ridibundus*, проте, автори додатково зареєстрували невелику кількість гамет із геномом *P. lessonae* (Chmielewska et al., 2022).

Системи R-E були знайдені та описані на території Австрії (Tunner, Herrich-Tunner, 1992), Германії (Mayer et al., 2013), Данії (Rybacki, 1994), Польщі (Rybacki, 1994a; Rybacki, Berger, 2001; Sochi, Ogielska, 2010; Dedukh et al., 2020; Chmielewska et al., 2018, 2022), Чехії (Uzzell et al., 1977; Zavadil, 1994; Doležalková et al., 2016; Doležalková-Kaštánková et al., 2018;

Doležálková-Kaštánková, Mazepa et al., 2020), Сербії (Krizmanic, Ivanovic, 2010), України (Межжерин и др., 2007; Biriuk et al., 2016; Borkin et al., 2004; Ремінний, 2005; Микитинець, Сурядна, 2007; Suriadna et al., 2020; Морозов-Леонов, 2017, 2021a, б, 2023). R-E системи характеризуються невеликою кількістю триплоїдів (Шабанов, 2015), або їх повною відсутністю (Doležálková-Kaštánková et al., 2018) наряду з великою кількістю диплоїдних гібридів (із переважанням самців) та особинами *P. ridibundus*. Більше того, в деяких системах була зареєстрована відсутність однієї із гібридних форм. Наприклад, чеські R-E системи в р. Одер характеризуються відсутністю гібридних самок (Doležálková-Kaštánková et al., 2018), а деякі українські R-E системи в р. Сіверський Донець характеризуються наявністю тільки гібридних самок із геномом LLR (Дрогваленко и др., 2017). Очікується, що відтворення в таких системах відбувається завдяки тому, що гібриди формують гамети *P. lessonae*. Однак, частка гібридів, які продукують лише L-гамети є відносно низькою (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; Doležálková-Kaštánková et al., 2016; Doležálková-Kaštánková et al., 2018; Doležálková-Kaštánková, Mazepa et al., 2020; Pustovalova et al., 2022, 2023). При цьому, велика кількість гамет, які продукуються гібридами, є нежиттєздатними і призводять до високої смертності серед потомства або повної гібридної стерильності. Через такі особливості, ці популяційні системи були названі недосконалими (англ. leaky) (Uzzell et al., 1977). В таких системах було вперше зареєстровано особин, у яких в сім'яниках були одночасно присутні два типи клітин зародкової лінії, причому перший із них відповідав геному *P. lessonae*, а інший - *P. ridibundus*. Такий феномен отримав назву «гібридної амфіспермії» (Vinogradov et al., 1990, 1991). Проте, якщо брати до уваги і самок, то є доцільним використання терміну «гібридна амфігаметність» (Dubey et al., 2019; Pustovalova et al., 2022). За допомогою різних методів було показано, що самці у таких системах формують велику кількість гамет із геномом *P. ridibundus*, проте, у деяких системах

спостерігається висока частка амфіспермічних самців, а також таких самців, що є стерильними (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017; Doležálková et al., 2016; Doležálková-Kaštánková, Mazera et al., 2020; Pustovalova et al., 2022, 2023; Chmielewska et al., 2022). Дослідження гаметогенезу у невеликої кількості триплоїдних гібридних самців та самок показали, що здебільшого триплоїди елімінують із клітин зародкової лінії той геном, який є у меншості (L у LRR, R у LLR) (Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; Biriuk et al., 2016; Pustovalova et al., 2023). Проте, траплялися випадки, коли триплоїдні самки LLR продукували суміш гамет R і LR, і таким чином робили вклад у підтримку появи триплоїдів (Dedukh et al., 2013, 2015, 2017).

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), Польщі (Rybacki, Berger, 2001; Pruvost et al., 2013b; Chmielewska et al., 2018, 2022; Dedukh et al., 2019), Швейцарії (Hoffmann et al., 2015; Dubey et al., 2019), Словацької (Mikulíček, Kotlík, 2001; Pruvost et al., 2013b; 2015; Hoffmann, Reyer, 2013), Чеської Республік (Vinogradov et al., 1990; Zavadil, 1994), України (Межжерин и др., 2007; Усова, 2010). Майже у всіх «чистих» гібридних популяціях були знайдені триплоїдні особини. Розмноження в таких системах пов'язане з тим, які гамети продукують гібриди і воно відбувається за рахунок того, що різні гібриди елімінують один з батьківських геномів, передаючи L або R гамети (Pruvost et al., 2013b; 2015; Christiansen, Reyer, 2009; Vinogradov et al., 1991; Christiansen et al., 2005, 2010; Christiansen, 2005, 2009), також в цих системах так само зустрічаються особини, які роблять одночасно декілька типів гамет (Vinogradov et al., 1991). У словацьких популяційних системах диплоїди продукують гамети з R-геномом, а триплоїдні LLR – у переважній більшості

LL-гамети (Mikulíček, Kotlik, 2001; Mikulíček et al., 2014a; Pruvost et al., 2013b, 2015). Відтворення шведських, датських та німецьких «чистих» систем відбувається за рахунок того, що триплоїди формують гаплоїдні гамети L або R типу, а відтворення триплоїдів відбувається за рахунок того, що диплоїдні гібриди продукують диплоїдні гамети LR (Pruvost et al., 2013b; 2015; Christiansen, Reyer, 2009; Christiansen et al., 2005, 2010; Christiansen, 2005, 2009). Якщо зустрінуться між собою гамети L або гамети R, які продукувалися гібридами, то це призведе до появи особин батьківських видів (Christiansen, 2005, 2009; Plötner, 2009). Такі особини мають знижену життєздатність і зазвичай гинуть до метаморфоза або одразу після нього. Це явище було назване «гібридоліз» (Günther, Plötner, 1988; Plötner, 2009). Додатково, в деяких шведських популяційних системах були знайдені одиничні тетраплоїдні особини, більше того, відсоток таких особин серед пуголовків та метаморфів був вищим, що говорить про те, що такі особини є нежиттєздатними і гинуть у процесі онтогенезу (Arioli et al., 2010)

Хоча відсутність генетичного різноманіття в клонових популяціях може створювати проблеми для їх адаптивності та життєздатності, гібридизація та клональність залишаються важливими факторами в еволюції та підтриманні популяційних систем (Plötner, 2009). Необхідні подальші дослідження, щоб краще зрозуміти механізми та частоту гібридогенезу у представників популяційної системи кожного типу, а також його вплив на генетичне різноманіття та адаптивність цих популяцій.

1.8 Методи вивчення популяційних систем і особливостей відтворення зелених жаб, які їх населяють

Вивчення гаметогенезу у зелених жаб є важливою складовою розуміння механізмів відтворення зелених жаб і їх внеску у підтримку популяційних систем. Лешек Бергер ще майже 60 років тому повідомив про міжвидову гібридизацію у зелених жаб роду *Pelophylax*, схрестивши між

собою *P. lessonae* і *P. ridibundus* (Berger, 1968, 1977, 1983a). Пілотні дослідження гаметогенезу були зроблені Бергером у 1968 році. За результатами схрещування робили висновки про гамети, які передавали гібриди (Berger, 1968, 1970, 1973, 1977). Проте, видову приналежність як батьків, так і всього потомства визначали виключно за комплексом зовнішніх ознак (Berger, 1970, 1973, 1988). Після його досліджень австрійський генетик Тюннер показав, що існування зелених жаб підтримується завдяки гібридогенезу (Tunner, 1974). А отже, феномен геміклонального спадкування необхідно досліджувати методами, які б дозволили визначати кількість, форму хромосом, а також особливості генотипів як гібридів, так і батьківських видів.

З першої половини ХІХ ст. були описані каріотиби зелених жаб (Wickbom, 1945), а також знайдені триплоїдні особини (Hertwig, Hertwig, 1920). Каріотиби *P. lessonae* та *P. ridibundus* представлені 26 хромосомами (13 пар), серед яких 5 пар великих і 8 пар маленьких хромосом (Günther, 1970; Neppich, 1978; Alpagut, Falakali, 1995; Shehri, Saleh, 2005; Сурядная, 2015). Метафазна пластинка гібрида *P. esculentus* значуще не відрізняється від метафазної пластинки будь-якого з батьківських видів, що значно ускладнює встановлення видової приналежності. Однак, деякі автори (Сурядна, 2003, 2005b, 2015; Suriadna et al., 2020; Spasic-Boskovic et al., 1999) наголошують на тому, що гібрида можна відрізнити від батьківського виду по довжині першої пари хромосом – довжина першої хромосоми у *P. ridibundus* має бути більше, ніж у *P. lessonae*. У випадку *P. esculentus* перша пара хромосом буде гетероморфною. Сурядна Н. у своїх роботах також зазначає, що використовуючи центромерний індекс, як параметр оцінки довжини хромосом, можна побачити значущу різницю у першій парі хромосом (Сурядна, 2003, 2005b, 2015; Suriadna et al., 2020), проте Spasic-Boskovic та колеги (1999) значущої різниці не виявили. Також, у *P. lessonae* і *P. ridibundus* були знайдені відмінності у довжині 12 і 13 пар хромосом, у

гібрида 12 пара хромосом була гетероморфна. Додатково, на дев'ятій та третій хромосомах у гібридів були виявлені перетяжки (Суядна, 2003, 2005b, 2015). Переваги даної методики визначення виду неодноразово зазначалися у вищезгаданих та нещодавніх дослідженнях (Zalesna et al., 2011; Dedukh et al., готується до публікації), проте для отримання більш достовірних результатів необхідна велика кількість хромосомних пластинок високої якості з повним набором хромосом, а також виконання даної роботи вимагає вбивства всіх досліджуваних тварин і займає дуже багато часу.

Методи диференційного зафарбування хромосом є більш точними і досить успішно використовуються дослідниками. Вперше різницю між хромосомними наборами було показано С. Хеппіх, яка застосувала C-banding на метафазних пластинках клітин епітелію кишечника, однак, в подальшому авторка та її колеги застосовували Actinomycin D/33258 Hoechst (Heppich, 1978, 1982; Tunner, Heppich-Tunner, 1991). Під час такого флуоресцентного забарвлення центромери *P. ridibundus* мають інтенсивне світіння, а центромери *P. lessonae* – ні. Гібрид, у свою чергу, має половину хромосом із підсвіченою центромерою, який відповідає геному *P. ridibundus*, і половину хромосом без світіння центромери, який відповідає геному *P. lessonae*.

Масштабне дослідження хромосом було опубліковано Vucci et al. (1990). Автори використали C-banding і подвійне зафарбування AMD/DAPI, підтвердивши, що центромери *P. ridibundus* накопичують барвник в більшій мірі, що дозволяє відрізнити види між собою. Крім того, автори детально проаналізували та описали хромосоми типу лампових щіток обох батьківських видів та їх гібрида, які утворюють *P. esculentus* complex. Хромосоми типу лампових щіток - це хромосоми, які перебувають на стадії диплотени мейозу I у вигляді напівбівалентів, які об'єднані між собою хіазмами (Callan, 1986). Ці хромосоми присутні в зростаючих ооцитах зелених жаб і їх аналіз дозволяє визначати, який геном передає самка у кожній із своїх ікринок. Лампові щітки із ооцитів батьківських видів

відрізняються між собою за кількістю, формою, положенням велетенських петель, частотою хіазм, а також за вираженістю центромер (Bucci et al. 1990). Також, за цими характеристиками можна визначити, які геноми передаються у гаметах ди- та триплоїдних гібридних самок (Dedukh et al., 2013; 2015; 2017; 2019).

Одним з найуспішніших методів для диференціації геномів *P. lessonae* та *P. ridibundus* стала методика *in situ* гібридизації (Ragghianti et al., 1995, 2007; Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; Zalesna et al., 2011; Doležálková et al., 2016). Флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH) базується на тому, що виділені з ДНК *P. ridibundus* центромерний повтор RrS1 (Ragghianti et al., 1995) та з ДНК *P. lessonae* центромерний повтор Ples289 (Choleva et al., 2023) розмножуються методом ПЛР, мітяться гаптенами, дигоксигеніном (Ples289) або стрептавідином (RrS1), зв'язаних з флуорохромами. Після проведення усіх маніпуляцій, у випадку *P. ridibundus* усі перицентромерні ділянки хромосом демонструють яскравий сигнал. У випадку *P. lessonae* 10 та 11 пари хромосоми *P. lessonae* демонструють яскравий сигнал. У випадку *P. esculentus* частина хромосом, яка отримана від *P. ridibundus* має яскраві перицентромерні сигнали, 10 та 11 хромосоми іншої частини хромосом мають перицентромерний сигнал *P. lessonae*. Даний маркер можна використовувати також для диференціації гамет та ядер інтерфазних клітин, за тим, які геноми вони несуть (Ragghianti et al., 2007; Dedukh et al., 2019, 2020; Pustovalova et al., 2022; Chmielewska et al., 2022). Дана методика також успішно застосовується для вивчення механізмів елімінації геному у зародкових клітинах гонад гібридних пуголовків (Chmielewska et al., 2018, 2022; Dedukh et al., 2019, 2020; Choleva et al., готується до публікації). За допомогою FISH було показано, що кожне мікроядро має одну хромосому, при чому наявність сигналу перицентромерного повтору *P. ridibundus* у цьому випадку свідчить про вибірккову елімінацію геному *P. ridibundus*, а відсутність сигналу свідчить про вибірккову елімінацію геному *P. lessonae*

(Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020; Choleva et al., готується до публікації). Геномна *in situ* гібридизація (GISH), а також порівняльна гібридизація геномів (CGH) базуються на тому, що ціла геномна ДНК одного або двох батьківських видів мітяться різними флуорохромами і таким чином хромосоми гібрида, забарвлені в два різні кольори, які відповідають *P. ridibundus* та/або *P. lessonae* (Zalesna et al., 2011; Doležálková et al., 2016). Також у роботі Залесної була показана присутність центромерного DAPI-позитивного гетерохроматину для хромосом *P. ridibundus* і його відсутність для хромосом *P. lessonae*.

Додатково, за допомогою FISH були виявлені інтерстиціальні сайти теломерного повтору (TTAGGG)_n на мітотичних та мейотичних хромосомах зелених жаб (Dedukh et al., 2013, 2015). Ці сайти були виявлені на ядерцеутворюючих хромосомах і було показано, що хромосоми *P. ridibundus* мають два інтерстиціальні сайти, а хромосоми *P. lessonae* мають один інтерстиціальний сайт на довгому плечі (Dedukh et al., 2013, 2015). При цьому, хоча завдяки цьому методу можна визначати, наприклад, хромосомні перебудови, дволанцюгові розриви та інше, він є трудомістким та потребує хромосомних пластинок високої якості, а також високої інтенсивності забарвлення сайтів теломерного повтору (Dedukh, Krasikova, 2017).

Сріблення або Ag-фарбування — метод диференціального фарбування хромосом, що виявляє райони ядерцевих організаторів на мітотичних хромосомах (ЯОР, сайти 18S + 28S рДНК) і ядерця в інтерфазних ядрах (Birstein, 1984; Sumner, 2003). Проте, різні джерела повідомляють про різну пару хромосом, яка несе ЯОР – дев'ята (Birstein, 1984; Zalesna et al., 2017), десята (Ullerich, 1967; Birstein, 1984; Spasic-Boskovic et al., 1999; Zalesna et al., 2017). Застосовуючи даний метод на клітинах із соматичних тканин, можна визначити плідність особини за кількістю ядерець (два для диплоїдів, три для триплоїдів відповідно) (Бірюк, 2017).

Проблема визначення статі і її зв'язок із спадковістю, геномами, клональністю ускладнена тим, що хромосоми зелених жаб є гомоморфними (Heppich, 1978). Вважається, що самці є гетерогаметними за результатами схрещувань, не дивлячись на численні виключення (Berger et al., 1988; Christiansen, 2005, 2009). Лише в одному дослідженні за допомогою BrdU-Hoechst-Giemsa бендінга було показано, що четверта хромосомна пара є статевою, а самці – гетерогаметні (Schempp, Schmid, 1981). Відмінності полягали у паттерні реплікації, проте у іншому дослідженні даних паттернів не спостерігалось (Miura, 1995). Додатково зазначалося, що друга пара хромосом також є статево-специфічною (Shehri, Saleh, 2005), проте жодні дослідники не спостерігали даного явища при подальших дослідженнях, пов'язаних з каріотипом зелених жаб.

Також, для ідентифікації видової приналежності зелених жаб і вивчення гаметогенезу використовують і цитометричні методи. Метод проточної ДНК цитометрії, який дозволяє з високою точністю розрізняти геноми, які містять клітини (Vinogradov et al., 1990, 1991; Mikulíček et al., 2014; Pruvost et al., 2015; Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017). Проточна цитометрія ДНК є методикою, яка має кілька переваг при дослідженні видів *Pelophylax*. По-перше, це швидкий і точний метод вимірювання рівнів плоідності та розміру геному, що може бути важливим для дослідження гібридизації та поліплоїдизації, оскільки клітини *P. ridibundus* містять в середньому на 16% більше ядерної ДНК, ніж клітини *P. lessonae* і на 8% більше, ніж *P. esculentus*. По-друге, проточна ДНК цитометрія може надати уявлення про генетичне різноманіття та еволюційну історію різних видів *Pelophylax* (Biriuk et al., 2016). Однак використання проточної ДНК цитометрії у дослідженнях зелених жаб також має деякі недоліки. Для цієї техніки потрібні свіжі або заморожені зразки тканин, які може бути важко отримати для деяких видів або популяційних систем. Крім того, методика може бути дорогою та вимагає спеціального обладнання та досвіду. Хоча

проточна ДНК цитометрія може надати інформацію про рівні плоідності та вміст ДНК, вона не надає інформації про конкретні гени чи послідовності (Vinogradov et al., 1990, 1991). Також, за допомогою даної методики не можна визначати геном, який передають самки в ооцитах.

Також для визначення геномного складу ооцитів, а також видової приналежності особин, використовують дані, отримані за допомогою аналізу білків. Одним з таких методів, які активно використовуються ще з 70-х років є метод розділення білків у поліакриламідному гелі шляхом електрофорезу (Uzzell et al., 1977, 1980; Graf, Mueller, 1979; Tunner, Heppich, 1981; Binkert et al., 1982; Günther et al., 1991; Gubanyi, Korsos, 1994; Kotlik, Sulova, 1994; Межжерин, Морозов-Леонов, 1994; Spasic-Boskovic et al., 1999; Mikulíček, Kotlik, 2001; Межжерин и др., 2007, 2010а, б; Krizmanic, Ivanovic, 2010; Biriuk et al., 2016; Fedorova, Shabanov, 2022;). Цей метод дозволяє побачити відмінності у алелях певних генів, які кодують ферменти. Так як *P. esculentus* є гібридом, багато з його генів перебувають у гетерозиготному стані, тому на електрофореграмі будуть спостерігатися зони білків, які характерні для батьківських видів (Uzzell, Berger, 1975; Günther et al., 1991; Межжерин и др., 2007). Завдяки цьому методу є можливим відрізнити диплоїдних гібридів від батьківських видів, а також дослідити геномний склад ооцитів (Uzzell et al., 1977, 1980; Graf, Mueller, 1979; Tunner, Heppich, 1981; Fedorova, Shabanov, 2022). Але даний метод не дозволяє відрізнити триплоїдів між собою, а також встановлювати плоїдність особин.

Більш надійним методом є аналіз мікросателітних локусів (Pruvost et al., 2013; Mikulíček et al., 2014; Christiansen, 2005, 2009; Hotz et al., 2001; Christiansen et al., 2005; Doležálková et al., 2018; Doležálková-Kašánková, Mazera et al., 2021). Для нього використовуються короткі фрагменти некодуєчої ДНК, які тандемно повторюються, і мутують через помилки в реплікації ДНК клітин зародкової лінії, і через це є надзвичайно варіабельними у кількості повторів. Мікросателітний аналіз дозволяє точно

визначати склад геномів як диплоїдних, так і триплоїдних зелених жаб, відрізняти види між собою і таким чином оцінювати генетичне різноманіття особин у різних популяційних системах, а також зафіксувати рекомбінації між геномами (Pruvost et al., 2013b; Mikulíček et al., 2014a; Christiansen, 2005, 2009; Christiansen et al., 2005; Doležálková et al., 2018; Doležálková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Мікросателіти є кодомінантними, тобто експресуються обидва алелі, що дозволяє точно визначити генотипи. Крім того, мікросателітне генотипування є відносно недорогим порівняно з іншими молекулярними методами, що робить його економічно вигідним методом дослідження. Однак мікросателіти також мають обмеження. Вони мають високий рівень мутацій, що може призвести до труднощів у встановленні еволюційних зв'язків. Деякі мікросателітні локуси можуть мати нульові алелі або випадання алелів, що призводить до неточних оцінок генетичного різноманіття та структури популяції (Dedukh, Krasikova, 2017; Doležálková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Крім того, мікросателіти представляють лише невелику частину геному, що обмежує кількість інформації, яку можна отримати про загальне генетичне різноманіття та структуру популяції (Christiansen, 2005, 2009). Тому ретельний розгляд цих обмежень є важливим при використанні мікросателітів для вивчення популяційних систем *Pelophylax*.

Додатково, існує спрощений метод, який призначений для кількісної оцінки варіацій довжини послідовності ДНК у певній геномній ділянці (інтрон-1 сироваткового альбуміну, SAI-1) серед зелених жаб (Hauswaldt et al., 2012). Метод базується на порівнянні рівня генної експресії у гібридів та батьківських видів. Для *P. ridibundus* був показаний найвищий рівень експресії, тоді як для *P. lessonae* експресія SAI-1 була взагалі відсутня. У випадку гібридів, диплоїдні LR мали проміжне значення рівня експресії, а у триплоїдів рівень експресії гену залежав від кількості геному *P. ridibundus* (RR > LRR > LR > LLR > LL). Цей метод є відносно швидким та дешевим, а

також підходить для обробки великої кількості матеріалу і служить цінним інструментом для вивчення генетичного різноманіття і популяційної генетики *Pelophylax*, у тому числі для вивчення інтрогресії геномів близькоспоріднених видів (*P. kurtmuelleri*, *P. bedriagae*) у геном *P. ridibundus* (Hauswaldt et al., 2012; Kolenda et al., 2017). Проте, використовуючи цей метод необхідно завжди мати контрольних особин батьківського виду, що дуже зменшує потужність використання методу для дослідження чистих E-систем. Також, метод не дозволяє досліджувати особливості гаметогенезу зелених жаб.

1.9 Історія дослідження зелених жаб на території Харківської області, заплави р. Сіверський Донець

Батрахофауна досліджуваного регіону має давню історію досліджень. Зелені жаби в цьому регіоні вперше були досліджені в XIX ст О. В. Чернаєм (1852), М. М. Сомовим (1897) та ін. У XX столітті Харківський університет став центром фауністичних досліджень Східної України (Атемасова та ін., 2019), зеленим жабам присвячено кілька праць, зокрема Шевченко (1956), Медведєва (1974), Шевченко та Василевської (1975) та інших. Однак ці роботи спиралися на морфологічні ознаки і не розглядали відкрите пізніше явище гібридогенезу. Вивчення гібридизації у зелених жаб у нашому регіоні почалося після її відкриття Л. Бергером (Berger, 1964) і підтвердженням гібридної генетичної природи *P. esculentus* (Tunner, 1974). В. І. Ведмедеря (1984) намагався розробити методи морфологічного розрізнення форм зеленої жаби за допомогою «мультиплікативного індексу С. В. Таращука», але лише в дослідженні Г. А. Лади (1998) з використанням проточної цитометрії ДНК були доступні надійні методи ідентифікації. Подальші дослідження Д. А. Шабанова, О. В. Коршунова та інших виявили високу частку триплоїдних гібридів у вибірках зелених жаб басейну Сіверського Дінця, ареал їх поширення розтягувався на декілька областей України і далі

на північ (Коршунов, 2010; Шабанов, 2015). Ці знахідки свідчать про те, що поява триплоїдів є не ізольованим, а природним явищем у цьому регіоні, коли диплоїдні, триплоїдні та навіть тетраплоїдні особини розмножуються разом.

Підтвердження наявності триплоїдних жаб у регіоні було досягнуто за допомогою каріоаналізу (Манило та ін., 2007), проточної ДНК-цитометрії та електрофорезу білкових маркерів (Коршунов, 2010; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017). Спочатку існування триплоїдів із геномним складом LLR у регіоні викликало дискусію (Коршунов, 2010; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017), але подальші дослідження з використанням різних методів (Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; Biriuk et al., 2016; Fedorova, Shabanov, 2022; Drohvalenko et al., 2021; Pustovalova et al., 2023) підтвердили їх присутність.

Високий рівень різноманітності зелених жаб, знайдених у Сіверському Донці Харківської області, зумовлений не тільки вивченням цього регіону, але й відображає його унікальні особливості. Ця теза підтверджується дослідженнями О. В. Коршунова (2008, 2010) та Д. А. Шабанова (2015), які показали, що сусідні регіони мають значно нижчий рівень різноманітності зелених жаб. Харківська область та північна частина Донецької області є найбільш різноманітними популяційними системами зелених жаб через наявність біотопів, оптимальних для існування *P. esculentus* (Коршунов, Шабанов, 2009).

Таким чином, високий рівень різноманітності зелених жаб у Сіверсько-Донецькому центрі різноманітності *Pelophylax esculentus* complex за описом Шабанова та ін. (2009, 2010), є причиною визначення його центром різноманітності. Згідно з визначенням Міжнародного союзу охорони природи (IUCN, 2022), осередок різноманіття – це територія, де мешкає значно більша кількість форм, ніж в інших територіях, і його застосування не пов'язане з заявами про місце походження обговорюваних форм.

У цьому регіоні поширені триплоїдні гібриди з двома каріогенетичними формами і обома статями (Borkin et al., 2004; Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; Коршунов, 2010; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017; Biriuk et al., 2016). Однак характер гаметогенезу гібридів у цьому регіоні не можна екстраполювати з інших територій через варіації плоїдності, складу геномів гамет і цитогенетичних механізмів. Різноманітні способи розмноження комплексу *Pelophylax esculentus* роблять його цінною моделлю для вивчення еволюційних процесів гібридизації, геміклонального розмноження та поліплоїдизації, які можуть призвести до поліплоїдного видоутворення.

Через таку унікальність, Шабановим Д. А. було запропоновано термін «геміклональна популяційна система» (ГПС) для того, щоб підкреслити виняткову унікальність в характері відтворення та екологічних особливостях, які характерні для *Pelophylax esculentus* complex у досліджуваному регіоні (Шабанов, 2015; Shabanov et al., 2020).

Однією з унікальних особливостей Сіверсько-Донецького центру різноманітності комплексу *Pelophylax esculentus* є повна відсутність *P. lessonae*, що призводить до клональної передачі геномів L через гібриди протягом багатьох поколінь (Borkin et al., 2004; Коршунов, 2010). Крім того, молекулярні дані вказують на те, що геноми *P. ridibundus* і *P. lessonae* з Сіверсько-Донецького центру різноманітності утворюють окремі гілки на філогенетичних деревах відповідних геномів, побудованих на основі даних мікросателітних послідовностей (Hoffmann et al., 2015), які сильно відрізняються від відповідних геномів в інших частинах ареалу комплексу *P. esculentus*. Це означає, що геноми R та L представляють незалежні еволюційні лінії. І загалом, гібриди у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб виникали незалежно і мали різне географічне походження. Відтворення геміклональних гібридів різних форм у цьому регіоні представляє значний інтерес.

У Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб проведено численні дослідження, у тому числі порівняльні цитологічні та фізіологічні дослідження ди- та триплоїдних *P. esculentus* (Borkin et al., 2004; Коршунов, 2010; Бондарева и др., 2012; Бірюк, 2017; Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2013, 2015, 2017; численні студентські тези з навчально-польових практик – доступні на сайті Batrachos.com). Ці дослідження дали дані про стійкість різних форм зелених жаб. Встановлено, що склад популяційних систем в регіоні змінюється з часом, а моніторинг кількох водойм дозволив встановити відмінності у складі вибірок (Шабанов, 2015; Shabanov et al., 2020; численні студентські тези з навчально-польових практик – доступні на сайті Batrachos.com). Також досліджено віковий розподіл та швидкість росту зелених жаб у регіоні, розроблено концепцію внутрішньо-популяційних онтогенетичних стратегій (Усова, 2010, 2014). Вважається, що смертність зелених жаб не залежить від їх віку (II тип кривої виживання за Р. Перлем) (Усова, 2010). Додатково, зареєстровані незначущі відмінності у швидкості росту між ди- та триплоїдами, а також *P. ridibundus* (Усова, 2014).

Численні дослідження, проведені в рамках Сіверсько-Донецького центру різноманітності зелених жаб, призвели до розвитку як емпіричних даних, так і теоретичних узагальнень, які дозволили розпочати моделювання трансформацій популяційних систем (Shabanov et al., 2020). Починаючи з 2006 року, ці спроби моделювання призвели до впровадження концептуальної моделі та створення імітаційних моделей за допомогою Microsoft Excel, Java, а згодом і R середовища (Кравченко, Шабанов, 2008, 2010; Кравченко та ін., 2011; Shabanov et al., 2020, 2023). Одним з важливих висновків із цих моделей була необхідність багаторівневої концепції відбору для пояснення спостережуваних явищ, оскільки їх неможливо пояснити відбором, що відбувається на якомусь окремому рівні. Незважаючи на значний обсяг отриманої інформації, подальшим дослідженням заважають

невирішені питання щодо особливостей гаметогенезу гібридів та систем схрещування в регіоні.

Сіверсько-Донецький центр різноманіття зелених жаб здебільшого населяють R-E-ГПС (Borkin et al., 2004, Коршунов, 2005, 2008, 2010), проте, для більш детального розуміння складу популяційної системи, а також задля підкреслення унікальності особливостей кожної із систем, Шабановим Д. А. була запропонована розширена класифікація ГПС (Шабанов, 2015). Для позначення диплоїдних гібридів використовується E-, для триплоїдних Ер-. Якщо гібриди або батьківський вид представлені виключно самцями або самками, то вживається «m» або «f» відповідно. Так, наприклад, назва R-E-Ер-ГПС означає, що дану систему населяють *P. ridibundus*, ди- та триплоїдні *P. esculentus* обох статей. У даній дисертації буде іти мова про декілька локалітетів, усі вони належать до R-E-Ер-ГПС типу. Гібриди в R-E системах Східної України представлені особинами з різною плоїдністю, статтю та складом геному (Borkin et al., 2004), що робить їх цікавим для вивчення об'єктом (Рис. 1.1).

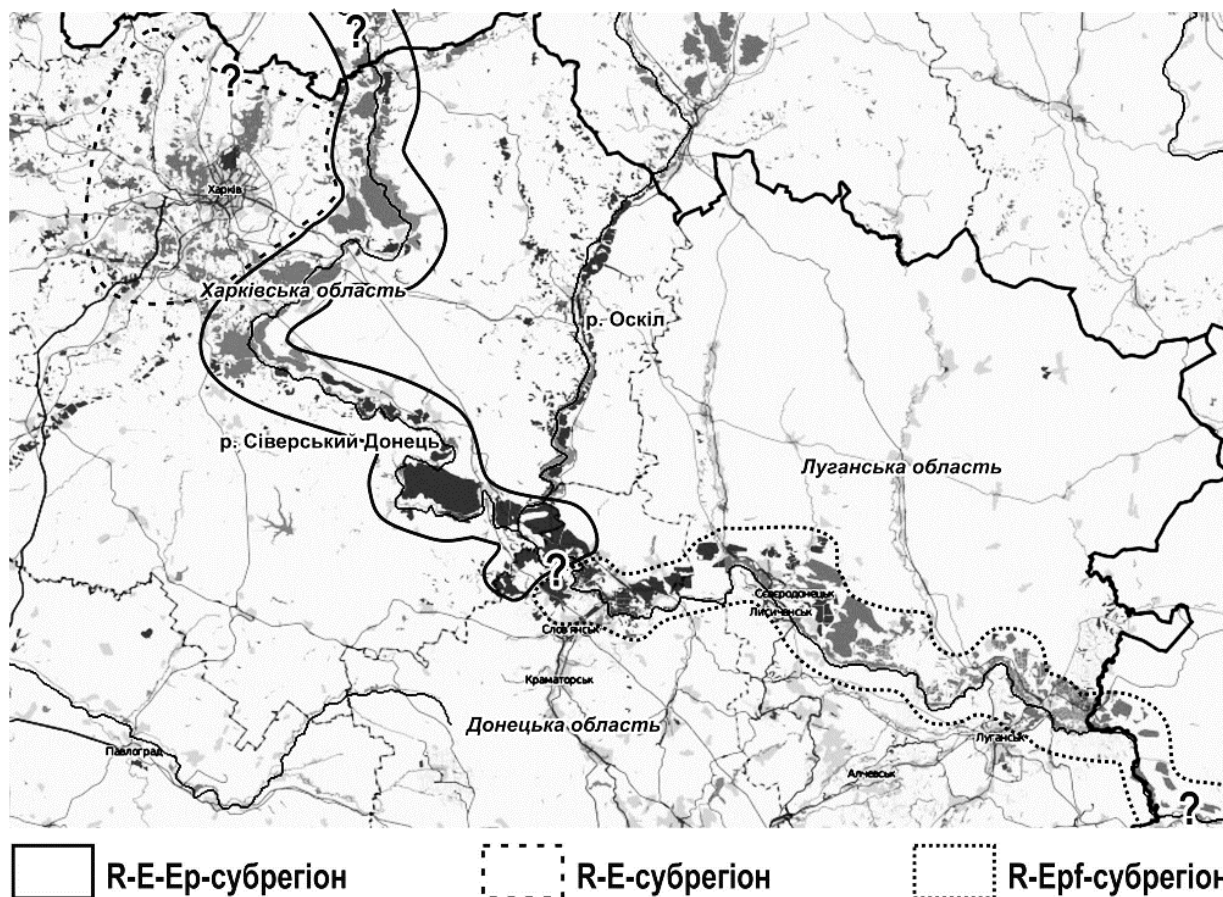


Рис. 1.1. Карта із субрегіонами геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex (дозвіл на використання таблиці надано одним із авторів, Шабановим Д. А., посилання – Шабанов та ін., 2017).

Загалом, для дослідження даного центру різноманіття зелених жаб було використано чи не найбільше методик у порівнянні з іншими регіонами досліджень у всьому світі, які виконані у співпраці з зарубіжними колегами, а також із залученням студентів під час проходження літньої навчально-польової практики.

Умовно, дані методики можна розділити на експрес методики, тобто ті, які виконуються порівняно недовго і дають загальне розуміння стану ГПС, а також ті, які є більш складними, довготривалими та дороговартісними, але дають більш точні і поглиблені результати. Більшість із цих методів були

використані під час виконання даної дисертаційної роботи і детально будуть описані у відповідному розділі.

Метод визначення виду за морфологією (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2009; Шабанов, 2015). Даний метод є неінвазивним, а також допомагає швидко оцінити стан ГПС і кількісні зміни у видовому та статевому співвідношенні особин у конкретній популяційній системі. Загалом, кожна особина має оцінюватися за комплексом зовнішньо-морфологічних ознак (колір шкіри, резонаторів, характер плям, відносні довжини стегон тощо) (Рис. 1.2). Комплекс складено на основі багаторічних досліджень, де визначення виду за морфологією було підтверджено більш точними молекулярними методами. Проте, недоліком даного методу є те, що майже неможливо відрізнити між собою ди- та триплоїдних особин. Також, морфологічне визначення є дуже неточним та приблизним, коли мова іде про цьогорічків та метаморфів зелених жаб.










Ознака	Ставкова жаба – <i>Pelophylax lessonae</i> (Camerano, 1882)	Їстівна жаба – <i>Pelophylax</i> <i>esculentus</i> (Linnaeus, 1758)	Озерна жаба – <i>Pelophylax</i> <i>ridibundus</i> (Pallas, 1771)
Розмір і форма внутрішнього п'яткового пагорбу	Напівкруглий 	Невисокий, часто напівкруглий, не скошений 	Плаский (низький), скошений 
Відносна довжина гомілки			
Забарвлення дорзальної поверхні тіла	Світло-зелена, трав'янисто-зелена та коричнева; ♂♂ під час нересту можуть бути лимонними, пігментних плям небагато, вони є темними	Світло-зелена або трав'янисто-зелена, коричнева або бронзового кольору; численні чітко окреслені чорні пігментні плями	Оливково-зелена з облямуванням плям або коричнева з великими коричневими (іноді зеленуватими) яскравими нерегулярними плямами
Дорзомедіальна смуга	Завжди є (форма <i>striata</i>)	Завжди є (форма <i>striata</i>)	Іноді є (форма <i>striata</i>), іноді немає (форма <i>maculata</i>)
Забарвлення вентральної поверхні тіла	Біле або злегка пігментоване, іноді з сірими плямами або мармурове	Біле або сіре мармурове	Від сірого до чорнуватомармурового або плямистого
Забарвлення дорзальної поверхні ділянки стегна, прикритої на зігнутій нозі гомілкою	Всередині та зовні інтенсивного жовтого або жовтогарячого кольору	З жовтими плямами (передусім у шлюбний період), майже завжди є теплий жовтий колір у малюнку	У задній частині білуваті, сіруваті, іноді зеленуваті плями, немає жовтих плям і теплого жовтого кольору
Забарвлення резонаторів у ♂♂	Завжди білі, абсолютно непігментовані	Від білого до темно-сірого (через усі відтінки сірого)	Від світло-сірого до чорного кольору
Запах	Слабкий запах	Сильний запах	Різкий специфічний запах
Шлюбна пісня самця (після «заспіву»)	Нагадує стрекотіння 	Проміжна за характером між батьківськими 	Розкотиста, що нагадує регіт 
Поведінка у разі небезпеки	Пропливають під водою й виринають	Проміжне між батьківськими видами	Ховаються на дні
Поведінка самців відносно конкурентів	Дуже агресивна	Агресивна	Відносно нейтральна
Зимівля	На суші	Спільно з батьківським видом	У воді
Місцеперебування, яким віддається перевага	Невеликі водойми лісової зони. Поза періодом нересту живе на суші	Різноманітні, крім крайніх типів, характерних для батьківських видів	Великі водойми відкритих ландшафтів

Рис. 1.2. Характерні ознаки представників зелених жаб (дозвіл на використання таблиці надано одним із авторів, Шабановим Д. А., посилання – Атемасова та ін., 2019).

Додатково, зелених жаб можна аналізувати на наявність зовнішньо-морфологічних аномалій. Дана методика також є неінвазивною. Наявність аномалій не є ознакою, яка пов'язана із видом, статтю або характером гаметогенезу (Kryvoltsevych et al., 2023). Проте, наявність аномалій може бути сигналом про стан навколишнього середовища, а також способом оцінити його вплив на тварин (Katrushenko, 2019; Kryvoltsevych et al., 2023).

Метод цитометрії еритроцитів полягає у тому, що у кожної особини беруть мазок крові на сухе скло і під мікроскопом роблять проміри щонайменше 30 еритроцитів, які у зелених жаб мають ядро, а тому їх розмір корелює із плоідністю, що було підтверджено багатьма дослідженнями (Berger, Roguski, 1978; Ogielska-Nowak, 1978; Ogielska et al., 1994; Бондарева и др., 2012). Проте, неодноразово були знайдені триплоїди із маленькими еритроцитами, а також диплоїди із великими (Ogielska et al., 2001). Ця різниця може бути пояснена ступенем конденсації хроматину, рівнем оксигенації, а також загальним рівнем метаболізму особини (Бондарева, Седова, Шабанов, 2013). Дана методика є інвазивною, оскільки фактично у тварини утворюється відкрита рана і підвищується ризик зараження, проте використання антибіотику (наприклад, Біцилін) знижує рівень зараження, а виділення слизу зі шкіри самої жаби прискорює загоєння рани.

Ще одним методом дослідження є *проміри довжини голівок сперматозоїдів*. Дана методика була розроблена під час студентської практики (Степаненко та ін., 2017) і продовжена дисертанткою. Нульовою гіпотезою було те, що за розміром довжини сперматозоїда можна визначити його плоідність (як і у випадку з еритроцитами). Проте, хоча і було знайдено дуже малі, середні та великі сперматозоїди, з'ясувати зв'язок плоідності та розміру сперматозоїда досі не вдалося (Fedorova, Pustovalova, 2022).

Доволі розповсюдженим є метод електрофорезу білків. Дана методика дозволяє за рівнем експресії білку розрізнити L та R геноми. У роботах під керівництвом С. В. Межжеріна (Межжерин, Морозов-Леонов, 1996, 1994;

Межжерин и др., 2007, 2010а, б) таким чином визначали вид зелених жаб, у тому числі спійманих на території Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Дана методика є інвазивною, оскільки тварину необхідно вбити. Також, за допомогою цієї методики було визначено, які типи гамет продукують самиці зелених жаб із Сіверсько-Донецького центру різноманіття (Biriuk et al., 2016; Fedorova, Shabanov, 2023). Дана методика гарно підходить для того, щоб швидко оцінити склад популяції, проте, має такі самі недоліки, як і цитометрія еритроцитів. Автори низки робіт наголошують на тому, що для більш точного визначення геному необхідно аналізувати експресію декількох білків (Uzzell et al., 1975, 1977, 1980).

Одним із найпопулярніших методів дослідження є метод аналізу мікросателітних послідовностей. Мікросателіти є популярним генетичним інструментом у вивченні популяцій *Pelophylax* завдяки їх високій мінливості та здатності розрізняти особини та популяції. Нещодавні дослідження показали, що L-геном у декількох системах є клональним, причому, існує щонайменше три варіанти клонального L-геному (Fedorova et al., готується до публікації). Проте, через свою варіабельність методика не є досконалою та універсальною, оскільки для кожної популяційної системи необхідно постійно шукати новий набір мікросателітних послідовностей для того, щоб точно визначати вид представників з досліджуваної системи (Arioli et al., 2010).

Одним з найточніших методів визначення виду, плоідності особин та гамет, які вони продукують, а також геному, який міститься у гаметах, є метод проточної ДНК цитометрії. За допомогою неї було визначено характер продукування гамет самцями зелених жаб з різних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття (Бірюк, 2017; Biriuk et al., 2016). Гібридні самці з більшості локалітетів виробляють сперматозоїди з геномами *P. lessonae* і *P. ridibundus*, суміш гаплоїдних сперматозоїдів з геномами

P. ridibundus і *P. lessonae* одночасно, тобто є амфіспермічними (Biriuk et al., 2016).

Ключовими методами, які дають найбільш достовірні результати і використовувалися в даній роботі, є методи дослідження хромосом з соматичних тканин та тканин зародкових тканин. Проте, дані методики майже завжди потребують вбивства тварин. В даній роботі хромосоми отримували із тканин кишківника, кісткового мозку, а також сім'яників і детально будуть описані у розділі «Матеріали і Методи».

Однією із найпотужніших методик, які дозволяють побачити, які гамети продукують самиці є методика отримання хромосом типу лампових щіток (ЛЩ). Цей тип хромосом дуже розтягнутий і має характерний «щіткоподібний» вигляд з численними бічними петлями, які містять активні сайти транскрипції.

Дослідження ЛЩ хромосом показали, що різні види мають різний характер хромосомних петель, а також різняться за ядерцеутворюючою хромосомою. Детальний гаметогенез самиць із досліджуваного регіону було описано за допомогою цього методу, і виявилось, що гібридні самки зазвичай продукують гаплоїдні гамети з геномами *P. ridibundus* та/або *P. lessonae* та диплоїдні гамети з геномом LR (Dedukh et al., 2015, 2017; Biriuk et al., 2016). Однак, метод є дуже клопітким, а також не дозволяє проаналізувати велику вибірку тварин за короткий проміжок часу, оскільки вимагає вбивання тварини.

Оскільки ми не можемо визначати вид пуголовка жодним із вищезазначених методів, дисертанткою було відпрацьовано та вдосконалено методику отримання хромосомних препаратів із тканин регенованого хвостового плавця. Такі пуголовки можуть бути дорощені до метаморфозу, або випущені назад в природу, у місце, де їх відловили (Шерстюк та ін., 2016; Лукан та ін., 2017; Pustovalova et al., 2022).

Для подальшого аналізу хромосомних препаратів, використовуються різні методики забарвлення. Наприклад, методика С-бендінгу широко використовується для виявлення розподілу гетерохроматичних ділянок у хромосомах. Ці ділянки містять щільно упаковану ДНК і, як правило, транскрипційно неактивні. У *Pelophylax* методика С-бендінгу використовувалася для дослідження каріотипів (наборів хромосом) різних видів. Наприклад, у *Pelophylax esculentus* за характером забарвлення Гімзою ділянок хромосом можна ідентифікувати та порівняти закономірності розподілу гетерохроматину в батьківських видах і гібридах. Проте, методика неодноразово проводилася на тканинах зелених жаб з досліджуваного регіону і жодного разу не була успішною. Нашими колегами (Dedukh, Krasikova, 2017) було висунуто припущення, що дана методика не працює на зелених жабах із Східної України.

Методики гібридизаційного забарвлення хромосом *in situ* (флуоресцентна та геномна) є більш достовірними, проте потребують багато часу і є дорогішими. При використанні GISH ми можемо побачити забарвлені у різний колір батьківські хромосоми різного виду і таким чином визначити вид особини або геном у гаметах, які продукують як самці, так і самки. При використанні FISH ми бачимо забарвлені перичентромерні ділянки, які належать різним батьківським видам і так само визначити вид або геном у гаметах, які продукують як самці, так і самки. Методика FISH є ключовою методикою, яка використовувалася у даній роботі. У своїй роботі дисертантка детально описала гаметогенез гібридних самців *Pelophylax esculentus*, а також виявила значні порушення в їх гаметогенезі.

Загалом, методика може бути цінним інструментом для вивчення видів зелених жаб, а також визначення геному в їх гаметах, але необхідно враховувати обмеження та потенційні проблеми, пов'язані з цією технікою.

Отже, для вивчення видового та генетичного різноманіття зелених жаб, а також особливостей їх гаметогенезу застосовано чимало методик. Проте,

базуючись на перевагах та недоліках кожного методу, включаючи складність і точність інтерпретації отриманих результатів, витрачені ціну та час, ми можемо зробити висновок, що при плануванні будь-якого експерименту необхідно враховувати особливості тварин та їх місць перебувань, застосовуючи мультидисциплінарний підхід. На додаток, під час проведення досліджень необхідно мати у арсеналі декілька методик, кожна із яких нівелює недоліки іншої для досягнення максимально точних результатів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Обсяг та походження матеріалу для досліджень

Дисертанткою було оброблено 762 тварини дев'ятьма різними методами. Загалом, для всіх тварин вид було визначено за морфологією, для восьми тварин підтверджено за результатами DAPI фарбування клітин соматичних тканин, для 53 – за результатами FISH/CGH. Плоїдність для 758 жаб була визначена методом цитометрії еритроцитів, для 116 тварин підтверджена за допомогою Ag-фарбування клітин із соматичних тканин. Тип гамет, який передає кожен самець було встановлено за допомогою методу FISH на клітинах із тканин сім'яників для 52 особин, і підтверджено за допомогою CGH на клітинах із тканин сім'яників для чотирьох особин. З самця №833 не вдалося отримати матеріалу із тканин сім'яників. Деталі кожного з методів описані у даному розділі нижче. У додатковій таблиці №1 міститься узагальнююча таблиця, яка містить кількість жаб, їх вид та методи, якими їх було оброблено. Загалом, кодування тварин відповідає схемі: Рік + перша літера назви локалітету + порядковий номер особини, визначений випадковим чином, наприклад, 21К-01 означає, що жабу №1 відловили у 2021 році, у Коряковому ставі. Для деяких особин у тексті використовується нумерація тільки цифрами (наприклад, №833), якщо їх було проаналізовано методом Ag-фарбування клітин із соматичних тканин.

Загалом відбір матеріалу проводився в Харківській області (Східна Україна) протягом 2016–2023 років. У випадку дослідження складу популяційної системи, вибірку формували випадковим чином. Для дослідження складу популяційних систем, ми зібрали три вибірки жаб (ювеніли та дорослі) у вересні 2019 р., червні 2020 р. та серпні 2021 р. у штучній водоймі (30×35 м), розташованій на піщаній терасі р. Мож (с. Тимченки, Харківська область, Україна; 49.7492, 36.1629). Також, було зібрано десять вибірок жаб (дорослі та ювенільні особини) у червні-липні під час студентської практики в 2018-2021 роках в Іському ставку (околиці с. Гайдари, Харківська область, Україна; 49.627778; 36.282778, Коряковому ставку (49.615759; 36.312244) та Нижньому Добрицькому ставку (49.556501, 36.310094) (Рис. 2.1).

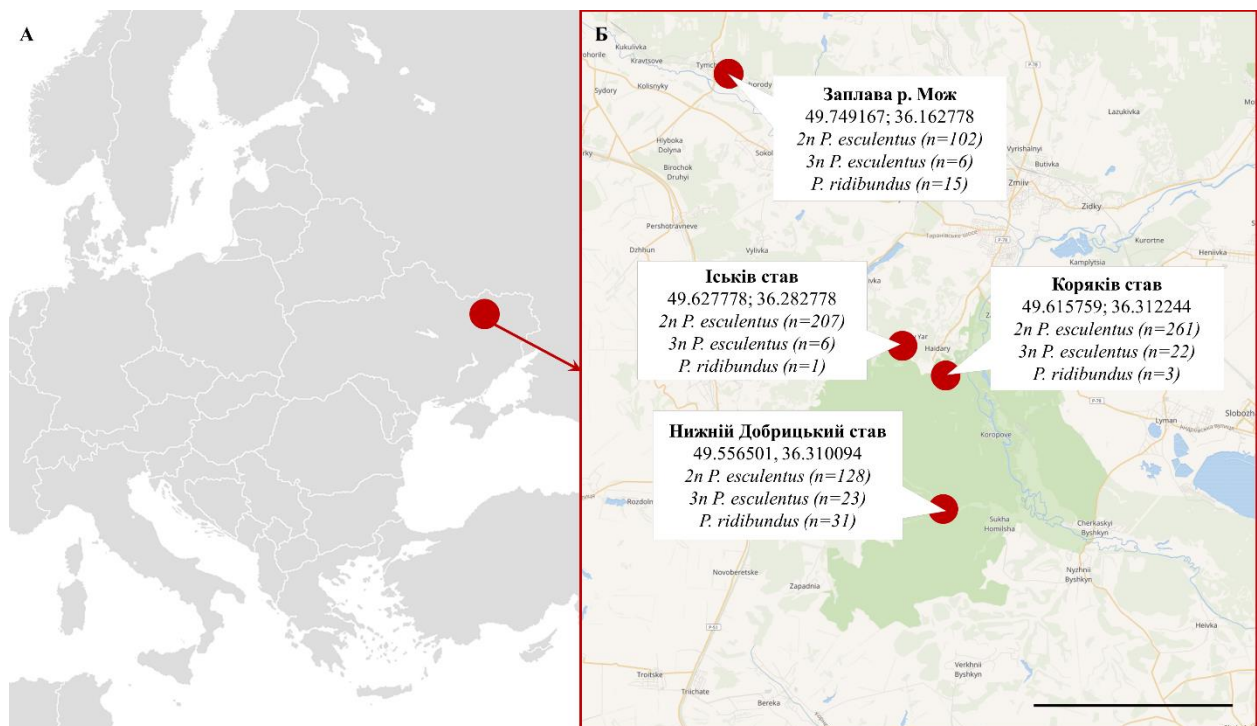


Рис. 2.1. Точки збору вибірок зелених жаб у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття (НПП «Гомільшанські ліси», околиці с. Гайдари, с. Тимченки, Чугуївський район). А) фрагмент карти Європи, Б) фрагмент карти Харківської області, Україна. Прямокутні виноски: назва місцевості, координати, плоідність і кількість зібраних жаб. Масштабна шкала = 10 км

Ми проаналізували гаметогенез у 52 дорослих самців *P. esculentus*, серед яких 48 особин були відловлені рандомно, а для чотирьох особин (17Т-5, 17Т-8, 17Т-10, 17U-4.2) потенційна амфіспермічність була встановлена Глібом Мазепою (Університет Упсали, Лозанна, Швейцарія) за аналізом потомства шляхом генотипування пуголовків за допомогою RADseq (Restriction site associated DNA markers) (Mazepa et al., 2018). Загалом, ми збрали вісім дорослих самців *P. esculentus* з р. Мож (49.749167; 36.162778), сім самців з Іськового ставку, одного самця з р. Уди (49.968333; 36.136944), сім самців з Корякового ставу та 30 самців з Нижнього Добрицького ставу. Ці географічно ізольовані популяційні системи характеризуються співіснуванням ди- та триплоїдних гібридів обох статей, представлених генотипами LR, LLR та LRR, а також *P. ridibundus* обох статей (Borkin et al., 2004; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017; Shabanov et al., 2020; Drohvalenko et al., 2021; Fedorova et al., готується до публікації).

Таксономічну та статеву ідентифікацію всіх дорослих особин проводили за зовнішньою морфологією (Berger, 1970, 1977; Plötner, 2005; Шабанов, 2015) (Рис. 2.2). Видова приналежність ювенільних особин із р. Мож визначалася за морфологією окремо і незалежно Д. Шабановим та О. Коршуновим, потім дані співставлялися і таким чином робилася приблизна оцінка видового складу серед молодих особин. Стать ювенілів визначали за морфологією гонад (Ogielska, 2009). Довжина тіла вимірювалася для всіх особин за допомогою штангенциркуля.

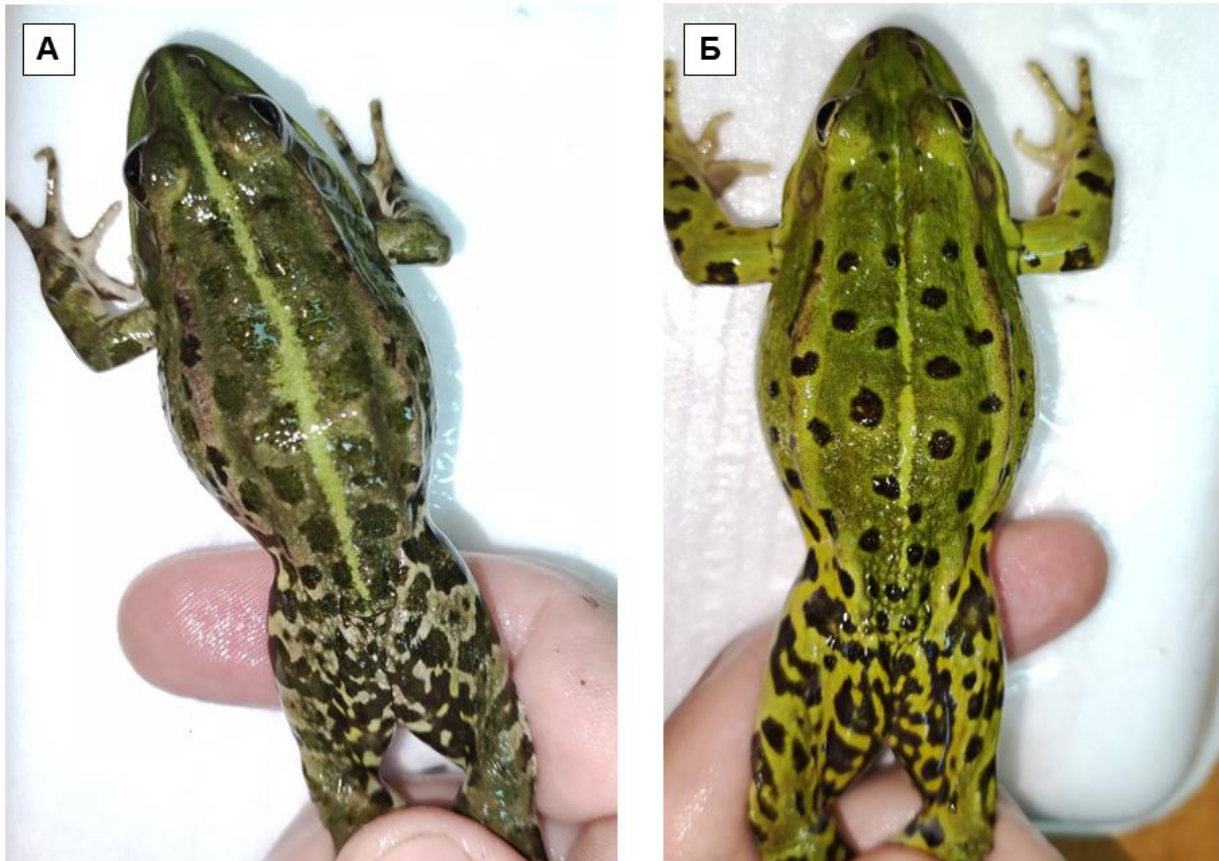


Рис. 2.2. Визначення видової приналежності особин за допомогою морфометричних ознак. Дорослі особини А) *P. ridibundus*, Б) *P. esculentus* із ГПС заплави р. Мож, визначені за морфологічними відмінностями у забарвленні дорзальної та вентральної поверхонь тіла, забарвленням резонаторів (темний у *P. ridibundus*), розміром і формою п'яткового пагорбу (напівкруглий у *P. ridibundus*), запахом (різкий у *P. ridibundus*). Більш детальні морфологічні відмінності надані у Рис. 2 (Атемасова та ін., 2019).

Плоїдність жаб, зібраних під час відловів для дослідження структури кожної геміклональної популяційної системи, оцінювали за середнім розміром еритроцитів, виміряних на сухих мазках крові (Ogielska-Nowak, 1978; Бондарева и др., 2012). Частині молодих та дорослих особин додатково проводили каріологічний аналіз з тканин епітелію кишечника та кісткового мозку (детальний опис нижче та у додаткових таблицях №2 та 3).

Відлов та утримування тварин відбувалися з дотриманням усіх норм поводження з тваринами, передбачених Законом України №3447-IV, а також Рекомендаціями Американського герпетологічного товариства щодо використання живих амфібій і рептилій у польових і лабораторних дослідженнях. Види *P. ridibundus* та *P. esculentus* не занесені до Червоної книги України і не підлягають охороні. Усі маніпуляції, які виконувалися із тваринами були погоджені із Комісією з біоетики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол 1/23 від 15.03.2023). Усіх тварин ловили за допомогою гідробіологічного сачка або вручну в нічний час, засліплюючи жабу за допомогою ліхтаря. Відлов відбувався з берега або, якщо збір унеможлиблювався через зарості, з човна.

Для безпечного транспортування спійманих тварин поміщали в зволожені полотняні мішки розміром 20×20 см або в пластикові контейнери ємністю 10-15 л з отворами. В лабораторії на базі ХНУ імені В. Н. Каразіна тварин утримували у індивідуальних скляних контейнерах з отворами зі зволоженою губкою на дні або наповнених вологим мохом сфагнумом (*Sphagnum sp.*). Приблизно раз на тиждень тварин промивали під проточною водою і за необхідності міняли сфагнум. Усі особини були попередньо відгодовані сирым курячим філе. Після отримання повних даних про склад популяції, тварин поміщували до карантину на невеликий період часу, а потім відпускали до місця їх збору.

Тварини, для яких проводився подальший аналіз (дослідження гаметогенезу, каріотипування) лишались в лабораторії в умовах, які описано вище. Жаби, відібрані для каріологічного аналізу перед умертвінням утримувалися близько тижня в індивідуальних контейнерах, при кімнатній температурі і годувалися 1-2 рази на день курячим філе або тарганями виду *Nauphoeta cinerea*. Така послідовність дій важлива для активізації процесів клітинного поділу в сім'яниках і кишечнику.

Детальні дані містяться у додаткових таблицях.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення плоїдності за допомогою методу цитометрії еритроцитів

Метод визначення плоїдності за мазками крові базується на тому, що ядра клітин триплоїдних гібридів містять у півтора рази більше хроматину. Це призводить до збільшення розмірів ядер і клітин в цілому (Günther 1977; Plötner, 2005). Мазки крові виготовляли, наносячи краплю крові на предметне скло. Потім краплю швидко розмазували тонким шаром ребром іншого предметного скла (Ogielska-Nowak, 1988; Бондарева и др., 2012). Мазки висушували і фотографували під мікроскопом Leica DM 2000 за допомогою USB-камери DFC3000 G (Рис. 2.3). Вимірювання довжини великої осі 50-100 еритроцитів проводили на фотографіях з використанням програми LAS X (ліцензія) за допомогою функції «Намалювати лінію», яка автоматично переводила усі проміри у мікрометри. Потім дані зі збережених фотографій переносилися вручну до таблиці Excel (ліцензія). Далі, за промірами як мінімум 30 окремо розташованих еритроцитів виводили середню довжину у мікрометрах. Якщо особина мала середню довжину більше, ніж 28 мкм, то її ідентифікували як триплоїдну, якщо менше – диплоїдну. Тих жаб, довжина еритроцитів яких лежала близько до 28 мкм, піддавали каріологічному аналізу.

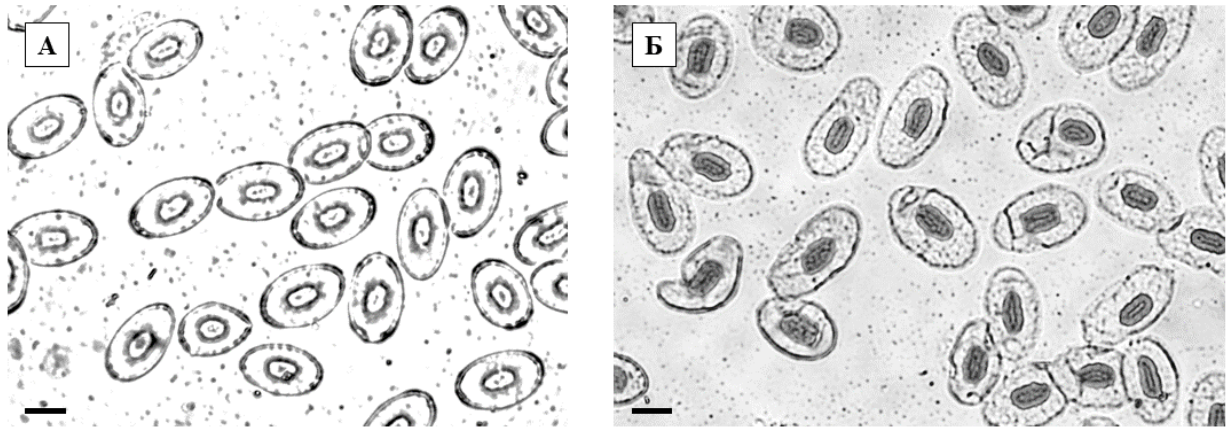


Рис. 2.3. Визначення плоідності за допомогою цитометрії еритроцитів на сухих мазках крові. А) диплоїдний (~26 мкм); Б) триплоїдний (~30 мкм) гібриди *P. esculentus*. Масштабна шкала = 10 мкм

2.2.2. Отримання препаратів розкапаних клітин із соматичних та зародкових тканин

Для більш точного підтвердження плоідності, жаби аналізувалися каріологічними методами (Macgregor, Varley, 1988; Бірюк, 2017). Жаб анестезували (присипляли) за допомогою парів етилацетату, лідокаїну або 1% розчину етилового ефіру 3-амінобензойної кислоти (MS 222), а потім проводили розтин, вилучаючи кишечник, кістковий мозок і сім'яники, які вимірювали за допомогою штангенциркуля. Результати усіх промірів заносили до таблиці, де кожний рядок відповідає усім зафіксованим характеристикам особини (Додаткові табл. 2, 3). Усі маніпуляції з тваринами, виконувалися із дотриманням техніки безпеки, з використанням гумових рукавиць та респіраторів.

Жабам вколювали ~0,5% розчин колхіцину (0,005 мл/г ваги) і залишали приблизно на 12-24 годин (Macgregor, Varley, 1988; Бірюк, 2017). Колхіцин впливає на збирання та розбирання мікротрубочок, які є важливими

компонентами цитоскелета клітини. Ці мікротрубочки відповідають за різні клітинні процеси, включаючи рух хромосом під час поділу клітини.

Під час поділу клітини (як мітозу, так і мейозу) хромосоми повинні бути точно розділені та розподілені в новоутворених дочірніх клітинах. Цей процес має вирішальне значення для підтримки належної генетичної інформації та функціонування клітин. Мікротрубочки утворюють мітотичне веретено, структуру, яка допомагає розділяти хромосоми під час поділу клітини (Nasmyth et al., 2001; Ohkura, 2015). Колхіцин пригнічує полімеризацію тубуліну, білка, який утворює мікротрубочки. Перешкоджаючи полімеризації тубуліну, колхіцин порушує формування та функцію мітотичного веретена. В результаті рух і розходження хромосом порушуються, що призводить до дефектів у клітинному діленні. Це втручання в нормальний процес клітинного поділу може мати декілька наслідків, зокрема уповільнення клітинного поділу (Macgregor, Varley, 1988). Всі дії з колхіцином виконувалися із дотриманням відповідних заходів безпеки.

Наступної доби жабу присипляли, вирізаючи у неї кишечник, кістковий мозок і сім'яники, які мацерували в гіпотонічному розчині протягом 20-30 хв. У якості гіпотонії використовували дистильовану воду або 0,07М КСІ. Такий час обробки зумовлений тим, що клітини розбухають і гарно візуалізуються. Потім тканини переносили у фіксатор Карнуа (3 частини етанолу або метанолу : 1 частина льодяної оцтової кислоти). Необхідно тричі проводити зміну розчину через кожні 30 хвилин з центрифугуванням (центрифуга Eppendorf MiniSpin) 3000 об/хв протягом 3 хвилин для кишечника та сім'яників, протягом 20 хвилин – для кісткового мозку (Macgregor, Varley, 1988; Бірюк, 2017).

Далі, з фіксованих матеріалів, які можна використовувати вже одразу після процедури фіксації, або через деякий час після зберігання у холодильнику на +4 °С, готувалися каріологічні препарати методом

розкапування. Для цього фрагмент тканини переносили до 70% розчину оцтової кислоти, де він мацерувався до утворення суспензії клітин. Отриману суспензію наносили на розігріті до +60 °С на терморегуляторі FALC предметні скельця ГРАНУМ за допомогою дозатору Eppendorf/LabMate/ГРАНУМ у вигляді крапель діаметром приблизно 1 см. Нанесені краплі негайно забирають піпеткою назад, в результаті чого на склі залишається невелика кількість ядер, хромосомних пластинок, а також сперматид. Препарати висушували і піддавали подальшій обробці. Якщо препарати планувалося зберігати, то їх поміщували до термостату (виробництво СРСР) при температурі +37 °С (Бірюк, 2017).

Остаточне визначення плоідності особини проводили за допомогою підрахунку хромосом із соматичних клітин кишківника або кісткового мозку (26 хромосом для диплоїдів або 39 хромосом для триплоїдів (Ogielska et al. 2004; Zaleśna et al. 2011) не менше, ніж в семи повних метафазних пластинках.

2.2.3. Виявлення районів ядерцевих організаторів на мітотичних хромосомах та у ядрах соматичних клітин за допомогою методу Ag-фарбування

У даній роботі для визначення або перевірки плоідності особини був використаний метод диференціального фарбування хромосом, специфічний для районів ядерцевого організатора. Цей метод дозволяє виявити в складі ЯОР кислих білків, зміст яких відбиває транскрипційну активність ЯОР в попередній інтерфазі (Miller et al., 1976).

Срібління або Ag-фарбування — метод диференціального фарбування хромосом, що виявляє райони ядерцевих організаторів на мітотичних хромосомах (ЯОР, сайти 18S + 28S рДНК) і ядерця в інтерфазних ядрах (Sumner, 2008). Фарбування проводилося за спрощеною методикою

(Macgregor, Varley, 1988) з використанням розчину желатину (Howell, Black 1980; Birstain, 1984; Вегерина и др., 2013; Бірюк, 2017).

Для фарбування використовували свіжоприготований 30% водний розчин AgNO_3 , який перед застосуванням фільтрували через шприцевий фільтр Simplepure Нью-Йорк (пори 0,22 мкм). Ємність з відфільтрованим розчином AgNO_3 зберігали в темному непрозорому стаканчику весь час фарбування. Потім 200 мг желатину розчиняли в 10 мл дистильованої води. Після розчинення в желатин додавали 100 μl мурашиної кислоти. На препарати за допомогою дозаторів наносили 75 μl розчину желатину (три краплі по 25 μl), з додаванням 150 μl розчин AgNO_3 (три краплі по 50 μl). Потім препарати накривали покривними скельцями і поміщали у вологу світлонепроникну камеру, яка була попередньо розігріта до +60 °С. Препарати витримували в термостаті протягом 3-5 хв при температурі +60 °С, після чого виймали, промивали під проточною водою. Далі препарати фарбували в 2% розчині барвника Гімза (ROTH; Merck) протягом 2-3 хвилин, промивали проточною водою або дистиллятом і висушували при кімнатній температурі. На отриманих препаратах сім'яників фотографували клітини, що знаходяться на різних стадіях мітотичного поділу під мікроскопом Leica DM2000 під прямим світлом зі збільшенням $\times 100$ з використанням імерсійного масла.

Слід зазначити, 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 (Рис. 2.4).

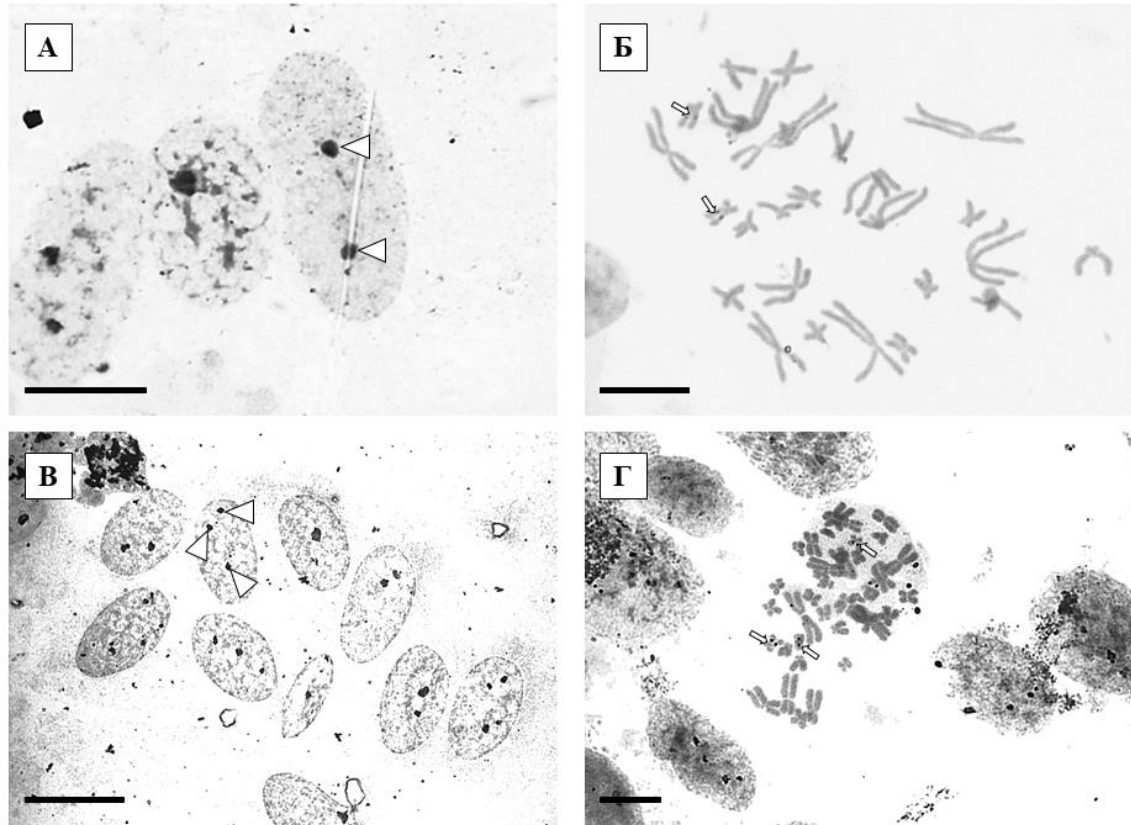


Рис. 2.4. Визначення плоідності за допомогою Ag-зафарбування інтерфазних ядер (А, В) та хромосом (Б, Г) із соматичних тканин дорослих особин зелених жаб. А, Б) інтерфазні ядра та диплоїдна метафаза мітозу із 26 хромосомами ($2n=26$) гібрида *P. esculentus*. В, Г) інтерфазні ядра та триплоїдна метафаза мітозу із 39 хромосомами ($3n=39$) гібрида *P. esculentus*. Наконечники стрілок вказують на ядерця всередині інтерфазних ядер (А, В); стрілки вказують на 9-ту пару хромосом (ядерцеутворююча пара) (Б, Г). Масштабна шкала = 10 мкм

2.2.4. Визначення геному у соматичних клітинах кишківника та / або кісткового мозку у особини за допомогою DAPI фарбування

Методика повторює перші етапи звичайного FISH (який буде описано детально нижче) до етапу нанесення зондів, який замінюється заключенням препаратів у DAPI (Рис. 2.5) (Ragghianti et al., 1995; Ogielska et al., 2004). Дана методика дозволяє відрізнити хромосоми батьківських видів між собою, а також батьківські види від гібридів за інтенсивністю забарвлення

перичентромерної ділянки на хромосомах. У випадку *P. ridibundus*, усі хромосоми мали інтенсивне світіння центромери (Рис. 7А), у випадку *P. lessonae*, усі хромосоми демонстрували відсутність світіння. *P. esculentus* займає проміжне положення, при якому світяться тільки перичентромерні ділянки хромосом *P. ridibundus* (Рис. 7Б). Оскільки в Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб є тільки один батьківський вид, використання даного методу є дуже корисним. Проте, методика потребує модифікацій, оскільки розрізнити між собою триплоїдів LLR та LRR було складно в першу чергу через низьку якість отриманих пластинок (Рис. 7В, Г, додаткова табл. 2).

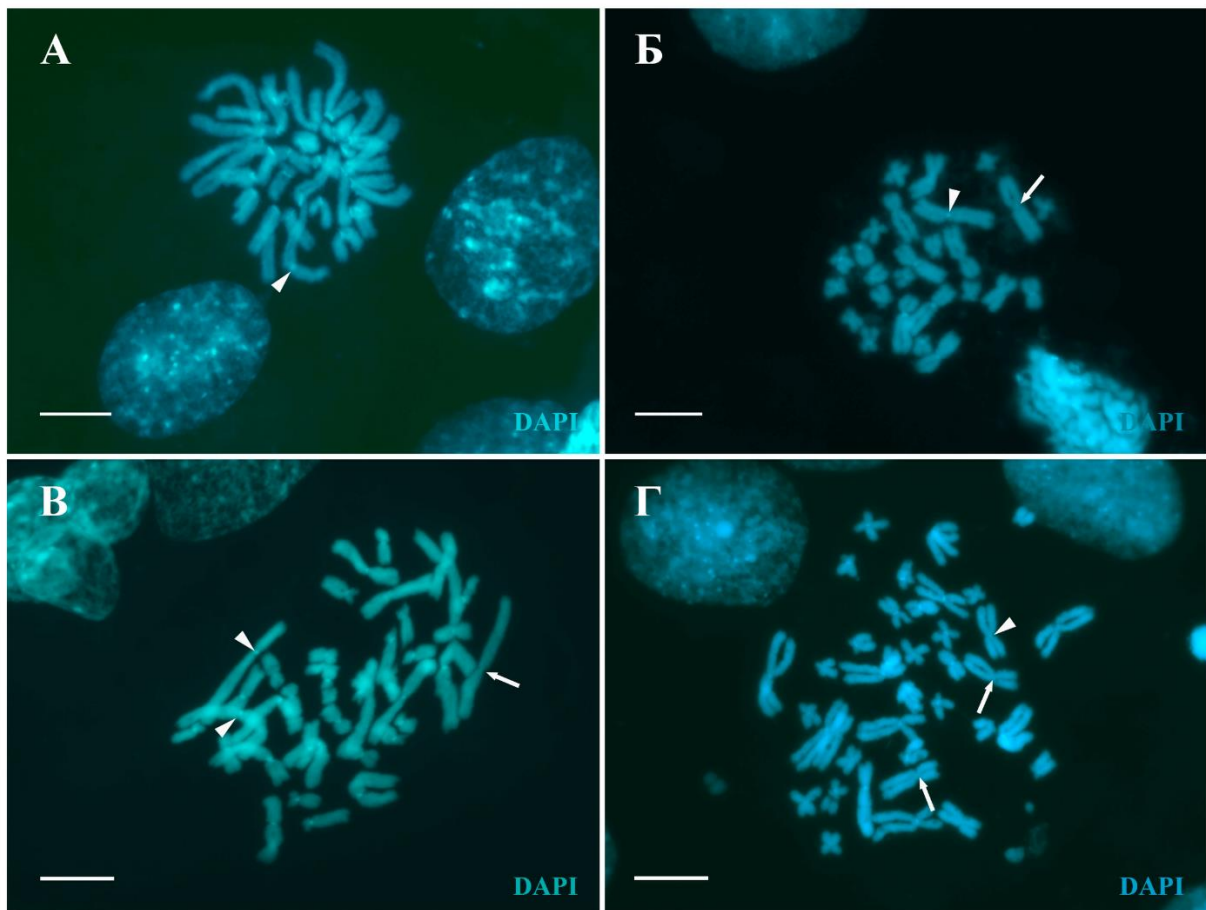


Рис. 2.5. Визначення видової приналежності особин за допомогою порівняння інтенсивності світіння центромерних ділянок хромосом із соматичних тканин після DAPI зафарбування. Хромосомна пластинка А) *P. ridibundus*, RR; Б) диплоїдного *P. esculentus*, LR; В) триплоїдного

P. esculentus, LRR; Г) триплоїдного *P. esculentus*, LLR. Стрілки вказують на хромосоми *P. lessonae*, наконечники стрілок вказують на хромосоми *P. ridibundus*. Масштабна шкала = 10 мкм

2.2.5. Приготування олігонуклеотидних мічених зондів шляхом ПЛР для мічення геному у клітинах із соматичних тканин та тканин сім'яників

Виділення ДНК з соматичних тканин (м'язи/кістки/тощо) від дорослих особин *P. lessonae* та *P. ridibundus* проводилося Пелікановою Шаркою (Інститут фізіології та генетики тварин, Лібехов, Чеська Республіка) з використанням комерційного набору реагентів для виділення ДНК (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, Netherlands) на базі лабораторії генетики риб Інституту фізіології та генетики тварин (Лабораторія генетики риб, с. Лібехов, Чеська Республіка). Зонд із послідовністю RrS1, який допомагає визначити хромосоми *P. ridibundus*, мітили біотином-16-dUTP (Roche) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Зонд із послідовністю Ples289 який допомагає визначити хромосоми *P. lessonae*, мітили за допомогою дигоксигеніну-16-dUTP (Roche) також методом ПЛР.

Для проби RrS1 ми використовували наступні праймерні послідовності (Ragghianti et al., 1995):

Прямий: 5'-AAGCCGATTTTAGACAAGATTGC-3'

Зворотній: 5'-GGCSTTTGGTTACCAAATGC-3'

Для проби Ples289 ми використовували наступні праймерні послідовності (Choleva et al., 2023):

Прямий: 5'-TTTGGCTTCCAAGGGCCGGG-3

Зворотній: 5'-TGACCAAAAACGACACTCCC-3

Для проведення ПЛР використовували 2 мкл буферу для ПЛР із MgCl₂ (створює необхідні умови для перебігу реакції) (Top-Bio s.r.o., Czech Republic), 2 мкл dNTP (склад суміші - 2мМ dATP; 2мМ dCTP; 2мМ dGTP; 1,3мМ dTTP) (Thermo Scientific, USA), 0,7 мкл біотин / дигоксигенін (Roche),

1 мкл енхансеру, 1 мкл ДНК-полімерази (фермент для реплікації, який додавали в самому кінці) (Top-Bio s.r.o., Czech Republic), 1,3 мкл ДНК *P. lessonae* або *P. ridibundus*, усю суміш доводили до 20 мкл дистильованою водою (Top-Bio s.r.o., Czech Republic). ПЛР проводили у термоциклері (C1000 Touch, Bio-Rad, USA), з кількістю циклів – 35. У першому циклі первинна денатурація відбувалася протягом 5 хв, в усіх наступних – 1 хв за температури +95 °С, відпал (для зв'язку одноланцюгової послідовності з праймерами) – 30 сек за температури +60 °С, елонгація (для реплікації матричного ланцюга) – 1 хв за температури +72 °С. На останньому циклі елонгація відбувається протягом 7 хвилин, і потім зонди охолоджувалися до температури +4 °С.

Електрофоретичне розділення отриманих центромерних послідовностей з ДНК обох видів проводили у 70-75 мл 0,8% поліакриламідного гелю (0,8 г поліакриаламіду розчинений у трисЕДТА-боратному електродному буфері) з 3 мкл етидію броміду протягом 30 хв у горизонтальній камері Scie-Plas (United Kingdom) під напругою 90V (Power Pac 300, Bio-Rad, USA). Гелі фотографували в ультрафіолетовому освітленні за допомогою транслюмінатора (Camag Reprostar II, Camag, Швейцарія), порівнюючи доріжки з контролем (1 мкл) (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

2.2.6. Визначення геному в клітинах сім'яників гібридних самців за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH)

Щоб дослідити гаметогенез 52 гібридних самців на розкапаних препаратах клітин сім'яників виконувалася методика флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) (Ragghianti et al., 1995) з певними модифікаціями (Dedukh et al., 2017, 2019; Pustovalova et al., 2022). Цей метод дозволяє визначити геном у гаметах, які продукуються зеленими жабами, а також оцінити особливості гаметогенезу. Також, FISH виконувався на препаратах із

соматичних тканин від цих самців для точного визначення їх видової приналежності.

Перед гібридизацією хромосомні препарати обробляли 0,005% розчином пепсину в 0,01M HCl і поміщували до вологої камери (кімнатна температура, 10 хв), промивали в 1× PBS (Phosphate buffered saline, Фосфатно-сольовий буфер) (10 хв) і фіксували в 2% PFA (Paraformaldehyde, параформальдегід) в 1×PBS (10 хв). Після промивання в 1× PBS (10 хв) слайди зневоднювали послідовно у розчинах етанолу (50%, 70% і 96%) (по 5 хв кожен з розчинів) і сушили за кімнатної температури.

Зонди Ples289 і RrS1 (2 мкл), отримані шляхом ПЛР, додавали до 10 мкл гібридизаційної суміші, що складалася з 50% формаміду, 20% декстрансульфату, 1 мкл 20× SSC (saline-sodium citrate, натрій-цитратний буфер) і 10-50-кратного надлишку ДНК сперми лосося.

Для сумісної денатурації на скло розкапували по 2 краплини (5 мкл) готової суміші зонду і накривали покривним склом 18×18 мм. Краї покривного скельця закріплювали гумовим клеєм і препарат поміщували на 3 хв на нагрівальний столик (FALC, Italy) за температури +73 °C, а потім зберігали протягом 10-12 годин при кімнатній температурі у вологій камері.

Для роздільної денатурації хромосомної ДНК усі предметні скла поміщали в 75% формамід на 3 хвилини при +73 °C до водяної бані (GFL, Germany), а потім зневоднювали послідовно в розчинах льодяного етанолу (70%, 80%, 96%) і на повітрі. Паралельно зонди денатурували при +86 °C протягом 6 хвилин у твердотільному термостаті (Grant-Bio PCH1, UK) і поміщали на лід щонайменше на 10 хвилин. Потім гібридизаційну суміш поміщали на предметні скла, накривали покривними скельцями розміром 18×18, краї яких заклеювали гумовим клеєм, та інкубували протягом 12 годин при кімнатній температурі. Після цього, в обох випадках, обережно прибирали гумовий клей і поміщували препарати у розчин 4× SSC з 0,1% Tween-20 на 15 хв для того, щоб м'яко позбавитись від покривних скелець.

Зонд відмивали протягом 5 хвилин у термошейкері (N-BIOTEK, South Korea) у розчині $0,2\times$ SSC за температури $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ з покачуванням 150 об/хв з потрібною зміною розчинів. Після цього на препарати наносили 100 мкл блокуючого розчину (0,5% бичачий сироватковий альбумін (Sigma-Aldrich, Merck, USA) у $1\times$ PBS), накривали парафільмом та залишали у вологій камері на 20 хв при кімнатній температурі. Зонди, мічені біотином і дигоксигеніном, виявляли протягом 2-3 годин у вологій камері при кімнатній температурі за допомогою стрептавідину, кон'югованого з флуорохромом Alexa 488 (Roche) і антитіл до дигоксигеніну, кон'югованого з флуорохромним родопсином (Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) відповідно розчиненими у блокуючому розчині у співвідношенні 1:40 та 1:100. Після цього предметні скла промивали $4\times$ SSC з 0,1% Tween-20 у термошейкері N-BIOTEK за температури $+43\text{ }^{\circ}\text{C}$, зневоднювали в серії етанолу (50%, 70% і 96%), висушували за кімнатної температури і наносили розчин Vectashield, що містить 1 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-діамідин-2-феніліндол) (Vector, Burlingame, Каліфорнія, США) та залишали препарати на пів години в холодильнику за температури $+4^{\circ}\text{C}$.

Після проведення усіх маніпуляцій, перицентромерні ділянки частини мітотичних хромосом, яка отримана від *P. ridibundus*, демонстрували яскравий сигнал, у випадку частини мітотичних хромосом, яка отримана від *P. lessonae* тільки перицентромерні ділянки 10 та 11 пари хромосом демонстрували яскравий сигнал. Для мейотичних метафазних хромосом, якщо ми спостерігали яскравий перицентромерний сигнал RrS1 на всіх або на 5 великих та 2-3 маленьких парах бівалентів та унівалентах, то ідентифікували такі метафази як ті, що мають геном *P. ridibundus*. Якщо ми спостерігали яскравий сигнал перицентромерного повтору Ples289 на 10 та 11 бі- та унівалентах, то ми ідентифікували їх як ті, що мають геном *P. lessonae*.

2.2.7. Отримання препаратів сперми

Самцям жаб вводили Сурфагон-Л (ТОВ «Ланс-Хім») — синтетичний аналог гонадотропін-релізінг-гормону (Боброва та ін., 2014). Зразки сперми фіксували розчином Карнуа (3 метанол : 1 льодяна оцтова кислота) і центрифугували (3000 об/хв) протягом 20 хвилин. Осад змішували з 70% льодяною оцтовою кислотою і розкапували на предметне скло (FALC, Italy), нагріте до +60 °С. Під час фіксації сперматозоїди зазвичай втрачають хвости, і тільки головки сперматозоїдів доступні для аналізу (Рис. 2.6) (Степаненко та ін., 2017).

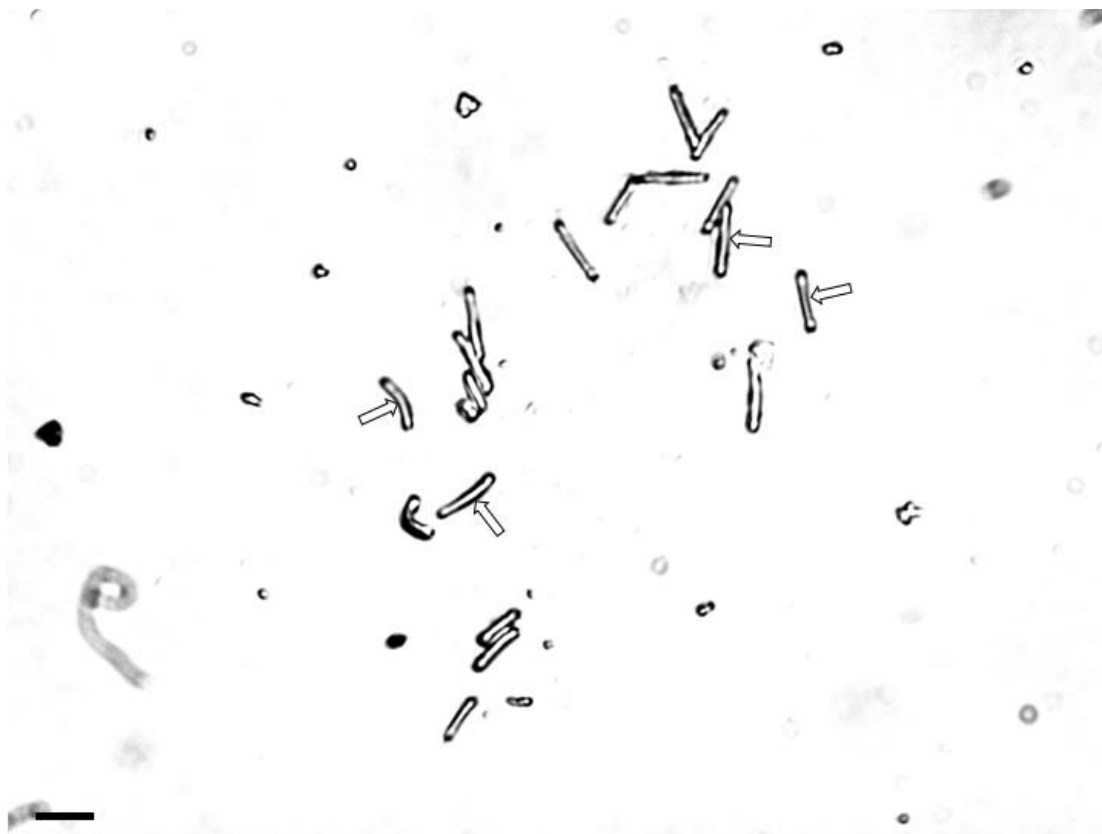


Рис. 2.6. Головки сперматозоїдів, отримані з уринальної сперми самців *R. esculentus*. Хвости були втрачені в процесі фіксації. Масштабна шкала = 10 мкм (фото – Федорова А. О.)

2.2.8. Визначення геному в клітинах сім'яників гібридних самців за допомогою порівняльної гібридизації геномів (CGH)

Для більш детального вивчення гаметогенезу і аналізу формування бівалентів у мейозі, для чотирьох особин ми виконали порівняльну геномну гібридизацію (CGH) на препаратах клітин отриманих з їх сім'яників, дотримуючись протоколу, описаного у роботах Doležálková et al. (2016) та Zalesna et al. (2011) з деякими модифікаціями. Геномну ДНК *P. ridibundus* та *P. lessonae* мітили Нік-трансляцією (Abbott Molecular, USA). Осадження ДНК виконували у такій послідовності – спочатку змішували 100 мкл ДНК з 10 мкл ацетату натрію та 1 мл льодяного спирту (96%) і залишали на 1 годину за температури -20 °С, далі отриману суміш центрифугували (центрифуга Universal 32R, Hettich, Germany) протягом 15 хвилин (14000 об/хв) за температури +4 °С. Після цього поверхневу рідину зливали, доливали 70% спирт, знову центрифугували за таких самих умов, зливали поверхневу рідину і осад залишали сушитись за кімнатної температури протягом 10-15 хв. До висушеного осаду додавали воду (~50 мкл). Нік-трансляційну суміш, яка складалася з 5 мкл буферу (Abbott Molecular, USA), 5 мкл dNTP (суміш нуклеотидів - 0,5мМ dATP, 0,5мМ dCTP, 0,5мМ dGTP, 0,1мМ dTTP) (Thermo Scientific, USA), 5 мкл dUTP (Біотин / Дигоксигенін), 10 мкл суміші з ензимів для нік-трансляції (панкреатична ДНКаза I, *Escherichia coli* ДНК полімераза I) (Abbott Molecular, USA) та 1 мкг осадженої ДНК (об'єм доданої ДНК залежить від концентрації, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра (ND-1000 UV-Vis, NanoDrop, Thermo Scientific, USA) доводили дистильованою водою до 50 мкл. Потім нік-трансляційну суміш поміщували до твердотільного термостату (Grant-Bio PCH1, UK) на 2 год 30 хв за температури +17 °С. Після цього ДНК, мічену нік-трансляцією, перевіряли за допомогою електрофорезу в 0,8% агарозному гелі для розподілення фрагментів ДНК за розміром до 200–500 пар основ. Мічені ДНК спільно осаджували шляхом інкубації протягом 2-3 годин за температури -20 °С з 5–

10 мкг ДНК сперми лосося, 11 мкл ацетату натрію та 4 об'ємами охолодженого 96% етанолу. Далі отриману суміш центрифугували протягом 15 хвилин (14000 об/хв) за температури +4 °С. Після цього поверхневу рідину зливали, доливали 70% спирт, знову центрифугували за таких самих умов, зливали поверхневу рідину і осад залишали сушитись за кімнатної температури протягом 10-15 хв. Спільно осаджену пробу ДНК ресуспендували в 30–40 мкл гібридизаційної суміші (50% формаміду, 20% декстрансульфату, 10% 20× SSC і 10-50-кратного надлишку ДНК сперми лосося) і інкубували 3-4 години, тримаючи пробірки із сумішшю у термошейкері (Eppendorf, Germany) за температури +37 °С із покачуванням 500-600 об/хв до повного розчинення осаду, який утворено зондом та конкурентною ДНК зі сперми лосося.

Перед гібридизацією хромосомні препарати обробляли 0,005% розчином пепсину в 0,01М HCl (0,1 мкл : 100 мкл) і поміщували до вологої камери (кімнатна температура, 10 хв), промивали в 1× PBS (10 хв) і фіксували в 2% PFA в 1× PBS (10 хв). Після промивання в 1× PBS (10 хв) слайди зневоднювали послідовно у розчинах етанолу (50%, 70% і 96%) (по 5 хв кожен з розчинів) і сушили за кімнатної температури.

Для роздільної денатурації хромосомної ДНК усі предметні скла поміщували в 75% формамід на 3 хвилини при +73 °С до водяної бані (GFL, Germany), а потім зневоднювали послідовно в розчинах льодяного етанолу (70%, 80%, 96%) і на повітрі. Паралельно зонди денатурували при 86°C протягом 6 хвилин у твердотільному термостаті (Grant-Bio PCH1, UK) і поміщали на лід щонайменше на 10 хвилин. Потім гібридизаційну суміш поміщали на предметні скла, накривали покривними скельцями розміром 18×18, краї яких заклеювали гумовим клеєм, та інкубували протягом трьох днів. Після цього, в обох випадках, обережно прибирали гумовий клей і поміщували препарати у розчин 4× SSC з 0,1% Tween-20 на 15 хв для того, щоб м'яко позбавитись від покривних скелець. Зонд відмивали протягом 5

хвилин у термошейкері N-BIOTEK у розчині $0,2\times$ SSC за температури $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ з покачуванням 150 об/хв з потрібною зміною розчинів. Після цього на препарати наносили 100 мкл блокуючого розчину (0,5% бичачий сироватковий альбумін у $1\times$ PBS), накривали парафільмом та залишали у вологій камері на 20 хв при кімнатній температурі. Зонди, мічені біотином і дигоксигеніном, виявляли протягом 2-3 годин у вологій камері при кімнатній температурі за допомогою стрептавідину, кон'югованого з флуорохромом Alexa 488 (Roche) і антитіл до дигоксигеніну (Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США), кон'югованого з флуорохромним родопсином (Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) відповідно розчиненими у блокуючому розчині у співвідношенні 1:40 та 1:100. Після цього предметні скла промивали $4\times$ SSC з 0,1% Tween-20 у термошейкері N-BIOTEK за температури $+43\text{ }^{\circ}\text{C}$, зневоднювали в серії етанолу (50%, 70% і 96%), висушували за кімнатної температури і наносили розчин Vectashield, що містить 1 мкг/мл DAPI (Vector, Burlingame, Каліфорнія, США) та залишали препарати на пів години в холодильнику за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.9. Отримання та обробка фотографій

Аналіз препаратів після срібління, FISH та CGH проводили за допомогою флуоресцентних мікроскопів OLYMPUS Provis AX70 (камера – DP30W Olympus, програмне забезпечення – Olympus Acquisition Software, Інститут фізіології та генетики тварин, Лібехов, Чеська Республіка) та Zeiss Metafer Axio Imager.Z2 (камера - CoolCube 1, програмне забезпечення - Metasystem software для автоматичного пошуку, зйомки та аналізу фотографій, Інститут фізіології та генетики тварин, Лібехов, Чеська Республіка) або Leica DM2000 (камера – DFC3000 G, програмне забезпечення – Leica LASX Software, ХНУ імені В. Н. Каразіна), оснащених набором відповідних світлофільтрів.

Попередню обробку фотографій проводили за допомогою програми Adobe Photoshop 2022 (ліцензія).

Підрахунок хромосом, сперматид та сперматозоїдів, інтерфазних клітин відбувався вручну для кожної фотографії. Результати занесені до додаткових таблиць № 4, 5 та 6. Проміри голівок сперматозоїдів виконувалися А. О. Федоровою у рамках спільних досліджень.

У ході досліджень гаметогенезу ми проаналізували 72 мітотичних і 3772 мейотичних хромосомних пластинок, 5793 сперматид та 1104 інтерфазне ядро неспецифічної клітини для кожного самця (загальна кількість проаналізованих самців - 52). У ході досліджень складу популяції ми проаналізували 855 (близько семи пластинок на одну особину) мітотичних пластинок з кісткового мозку та/або тканин внутрішнього епітелію кишківника від 116 особин.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Дослідження складу ГПС

Загалом для дослідження складу ГПС за 2015-2021 роки ми опрацювали 734 дорослих (*P. esculentus* (диплоїди і триплоїди), *P. ridibundus*), 28 ювенільних особин та 20 пуголовків з чотирьох локалітетів (Рис. 3.1).

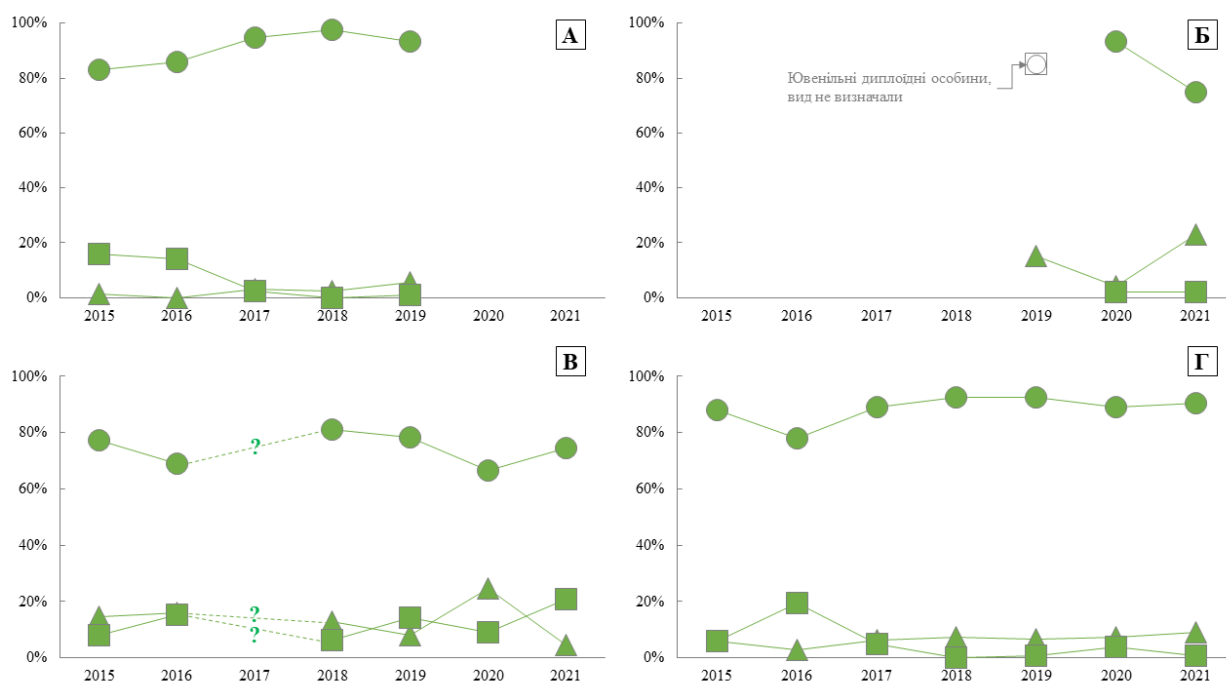


Рис. 3.1. Графіки коливання чисельності дорослих особин *P. esculentus* complex із чотирьох досліджених локалітетів. А) Іськів став; Б) заплава р. Мож; В) Нижній Добрицький став; Г) Коряків став. Круг – диплоїдні *P. esculentus*, трикутник - триплоїдні *P. esculentus*, квадрат - *P. ridibundus*. Знак питання на графіку В) означає, що у 2017 році вибірка зелених жаб із Нижнього Добрицького ставу не була рандомною.

Дані опубліковані у вигляді шести тез (Drohvalenko et al., 2019; Fedorova et al., 2019; Pustovalova et al., 2019, 2021; Shabanov et al., 2021; Zahoruiko et al., 2021) та однієї статті (Drohvalenko et al., 2021); дозвіл на використання частини даних (Черепашук и др., 2015; Біляєв та ін., 2018) був

наданий Д. А. Шабановим, оскільки дисертантка приймала участь у ловах та обробці вибірки (цитометрія еритроцитів, визначення плоідності методом срібління, догляд за тваринами).

3.1.1. Іськів став

Дисертантка розпочала дослідження Іськова ставку у 2015 році і брала участь у моніторингах у 2015, 2017-2019 роках (Рис. 9А). У 2015 році під час студентської практики ми проаналізували вибірку із 158 дорослих зелених жаб, серед яких 15% особин були визначені, як *P. ridibundus* (за морфологією), 1% як триплоїдні *P. esculentus* (за розміром еритроцитів), усі інші були визначені, як диплоїдні *P. esculentus*. Також, каріологічним методом (розкапування клітин кишківника) ми проаналізували 20 пуголовків (стадії 31-35 за Госнером), серед яких було знайдено лише одного триплоїда (Пустовалова и др., 2015). Вибірка 2017 року складалася з 137 дорослих особин, серед яких були 4,4% *P. ridibundus*, 1% триплоїдів, інші – диплоїдні гібриди (Горенский и др., 2017). У ході ловів у 2017 та 2018 роках не було знайдено жодного пуголовка. Також, у 2018 та 2019 роках не було знайдено жодного представника батьківського виду. Вибірка 2018 року складалася з 88 дорослих особин, серед яких було два триплоїда. Вибірка 2019 року була представлена 81 дорослою особиною *P. esculentus*, серед яких було знайдено чотири триплоїда, а також, було відловлено сім пуголовків (стадії 36-45 за Госнером), серед яких усіх особин було визначено, як диплоїдних. Загальна інформація про кількісний розподіл вибірок кожного року, а також внесок дисертантки наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Загальна кількість проаналізованих особин зелених жаб
(дорослі та пуголовки) та вклад дисертантки

Рік	Кількість дорослих особин			Кількість пуголовків		Вклад дисертантки, посилання
	<i>P. esculentus</i>		<i>P. ridibundus</i>	2n	3n	
	2n	3n				
2015	132	2	24	19	1	Обробка пуголовків каріологічним методом; Пустовалова и др., 2015; Допомога у обробці вибірки, догляд за тваринами (як частина студентської практики, Черепашук и др., 2015)
2017	129	2	6	–	–	Збір та обробка вибірки, аналіз даних; Горенский и др., 2017
2018	86	2	0	–	–	Збір вибірки, навчання студентів методиці обробки вибірки (цитометрія, морфометрія, каріологія), Біляев та ін., 2018 Дослідження сперматогенезу для п'яти дорослих диплоїдних гібридних самців, Pustovalova et al., 2022
2019	77	4	0	7	0	Збір та обробка вибірки, Обробка пуголовків каріологічним методом, Drohvalenko et al., 2019

3.1.2. Заплава р. Мож (с. Тимченки)

Загалом, за 3 роки досліджень даної популяції ми зібрали три вибірки – перша складалася із 27 ювенільних особин (сім самиць, 20 самців) для яких стать було встановлено за морфологією гонад. Серед них було чотири триплоїдних гібриди (дві самки, два самці) із генотипами LLR і LRR (Рис. 9Б). Так як для ювенільних особин експрес метод визначення виду за допомогою морфологічних ознак є ненадійним, тому встановити точний видовий склад даної вибірки не вдалося. Методом цитометрії еритроцитів всі жаби були визначені, як диплоїдні.

Друга вибірка складалася із 46 дорослих особин, серед яких була лише одна самка *P. ridibundus*, два триплоїдні самці *P. esculentus* із генотипами LLR, інша частина вибірки була представлена лише диплоїдними гібридними самцями. Методом цитометрії еритроцитів 43 гібриди були визначені, як диплоїдні, тобто мали еритроцити більше 28 мкм.

Вибірка 2021 року складалася як із ювенільних, так і із дорослих особин. Для ювенільних особин встановити точну видову приналежність не вдалося, за морфологією гонад серед 29 жаб було 11 самців (один триплоїд і десять диплоїдів) та 18 самок (усі диплоїдні). Серед дорослих особин було 13 самок (одна *P. esculentus* і 12 *P. ridibundus*) і 50 самців (47 *P. esculentus* і три *P. ridibundus*). Методом цитометрії еритроцитів всі гібриди були визначені, як диплоїдні.

Склад вибірок зелених жаб R-E-системи, яка населяє р. Мож наведено у таблиці 3.2. Дисертантка брала участь у кожному етапі обробки всіх трьох вибірок.

Таблиця 3.2

Загальна кількість проаналізованих особин зелених жаб (дорослі та ювенільні особини)

Форми зелених жаб			Рік		
Плоїдність	Вид	Стать	2019	2020	2021
Диплоїди (2n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	–	43	47
		Самка	–	-	1
	<i>P. ridibundus</i>	Самець	–	-	3
		Самка	–	1	12
	Ювеніли (вид не визначено)	Самець	18	–	10
		Самка	5	–	18
Триплоїди (3n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	–	2	-
		Самка	–	-	-
	Ювеніли (вид не визначено)	Самець	2	–	1
		Самка	2	–	-
Загальна кількість			27	46	92

3.1.3. Нижній Добрицький став

Дисертантка розпочала дослідження Нижнього Добрицького ставку у 2019 році і брала участь у моніторингах у 2019, 2020, 2021 роках.

Загалом за 2019-2021 роки, в рамках студентської літньої навчально-польової практики, ми проаналізували 190 особин зелених жаб, з них – 14 ювенільних особин, для яких вид та стать не визначалися, і 176 дорослих, для

яких вид та стать визначалися за комплексом морфологічних ознак. Плоїдність усіх проаналізованих жаб визначалася за довжиною еритроцитів. Для 18 особин додатково був проведений каріологічний аналіз для більш точного визначення їх плоїдності (Табл. 3.3).

Вибірка 2019 року складалася з 77 особин, серед яких було 13 ювенільних особин (усі диплоїдні), дев'яти дорослих особин *P. ridibundus* (п'ять самців, чотири самки) та 55 дорослих особин *P. esculentus* (п'ять триплоїдів (три самці, дві самки) та 50 диплоїдів (43 самці, сім самок)).

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)).

Вибірка 2021 року складалася з 67 особин, серед яких було 14 дорослих самок *P. ridibundus* та 53 дорослі особини *P. esculentus* (чотири триплоїди (три самці, одна самка) та 49 диплоїдів (46 самців, три самки)).

Усі вибірки значуще відрізняються між собою за кількістю особин *P. ridibundus* та триплоїдних *P. esculentus* ($p=0.01$, Chi-square=12.764), і як видно із графіку (Рис. 9В), спостерігається щорічне коливання чисельності *P. ridibundus* та триплоїдів (відсоткові дані розподілу за 2012-2018 роки були надані Д. А. Шабановим). Ми не порівнювали вибірки за статтю, бо вибірка є нерепрезентативною, оскільки збір матеріалу відбувався у червні-липні після нересту, і самки вже відійшли від водойми на той час.

Таблиця 3.3

Загальна кількість проаналізованих особин зелених жаб (дорослі та ювенільні особини)

Форми зелених жаб			Рік		
Плоїдність	Вид	Стать	2019	2020	2021
Диплоїди (2n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	43	26	46
		Самка	7	4	3
	<i>P. ridibundus</i>	Самець	5	1	-
		Самка	4	3	14
	Ювеніли (вид та стать не визначено)		13	1	-
Триплоїди (3n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	3	3	3
		Самка	2	8	1
	Ювеніли (вид та стать не визначено)		-	-	-
Загальна кількість			77	46	67

3.1.4. Коряків став

Дисертантка розпочала дослідження Корякова ставку у 2019 році і брала участь у моніторингах у 2019-2021 роках.

Загалом за 2019-2021 роки, в рамках студентської літньої навчально-польової практики, ми проаналізували 286 особин зелених жаб, з них – 14 ювенільних особин, для яких вид та стать не визначалися, і 272 дорослі особини, для яких вид та стать визначалися за комплексом морфологічних ознак. Плоїдність усіх проаналізованих жаб визначалася за довжиною

еритроцитів. Для семи особин додатково був проведений каріологічний аналіз для більш точного визначення їх плоідності (Табл. 3.4).

Вибірка 2019 року складалася з 126 особин, серед яких була одна доросла самка *P. ridibundus* та 120 дорослих особин *P. esculentus* (вісім триплоїдів (шість самців, дві самки) та 112 диплоїдів (103 самці, дев'ять самок)), для п'яти ювенільних особин стать визначити не вдалось, але морфологічно вони були визначені, як гібриди *P. esculentus* (один триплоїд, чотири диплоїди).

Вибірка 2020 року складалася з 36 особин, серед яких було дев'ять диплоїдних ювенільних особин, одна дорослі самка *P. ridibundus* та 26 дорослих особини *P. esculentus* (два триплоїди (один самець, одна самка) та 24 диплоїди (18 самців, шість самок)).

Вибірка 2021 року складалася з 124 особин, серед яких був один дорослий самець *P. ridibundus* та 123 дорослі особини *P. esculentus* (12 триплоїдів (десять самців, дві самки) та 111 диплоїдів (87 самців, 24 самки)).

Загальні дані представлені у таблиці 3.4.

Усі вибірки значуще не відрізнялися між собою за кількістю особин *P. ridibundus* та триплоїдних *P. esculentus* ($p=0.8$, $\text{Chi-square}=0.567$), і як видно на рисунку 9, ГПС Корякова ставу перебуває у стабільному стані за кількістю жаб різних форм, які його населяють (відсоткові дані розподілу за 2012-2018 роки були надані Д. А. Шабановим) (Рис. 9Г). Ми так само не порівнювали вибірки за статтю, бо вибірка є нерепрезентативною оскільки збір матеріалу відбувався у червні-липні після нересту, і самки вже пішли з водойми на той час.

Таблиця 3.4

Загальна кількість проаналізованих особин зелених жаб (дорослі та ювенільні особини)

Форми зелених жаб			Рік		
Плоїдність	Вид	Стать	2019	2020	2021
Диплоїди (2n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	103	18	87
		Самка	9	6	24
	<i>P. ridibundus</i>	Самець	-	-	1
		Самка	1	1	-
	Ювеніли (вид та стать не визначено)		4	9	-
Триплоїди (3n)	<i>P. esculentus</i>	Самець	6	1	10
		Самка	2	1	2
		Ювеніли	1	-	-
Загальна кількість			126	36	124

3.2. Дослідження гаметогенезу гібридних самців

Загалом ми дослідили 53 гібридних самців із чотирьох R-E-Ep-ГПС, розташованих у Східній Україні (Додаткові табл. 4, 5). Проаналізовано 30 гібридних самців з Нижнього Добрицького ставу, сім самців з Корякова ставу, вісім самців з річки Мож, сім самців з Іськова ставу та один самець із р. Уди. Довжина еритроцитів у диплоїдних гібридів коливалася від 22,30 до 27,96 мкм. Особини, які мали середнє значення довжини еритроцитів більше 28 мкм були ідентифіковані, як триплоїдні, хоча три самці (№ 23110, 2302, 823) мали довжину еритроцитів менше встановленої межі для триплоїдів

(25,9; 25,2; 26,8 мкм відповідно). Точну ідентифікацію складу геному та плоідності додатково оцінювали за допомогою каріотипування з Ag-фарбуванням, FISH та CGH. Аналіз ядерць за допомогою Ag-фарбування показав, що вісім з 53 гібридів були триплоїдними. Використовуючи FISH із видоспецифічними зондами, ми точно визначили склад геному для 45 диплоїдних гібрида LR (Рис. 3.2А), п'яти триплоїдних гібридів LRR (Рис. 3.2Б) і трьох триплоїдних гібридів LLR (Рис. 3.2В).

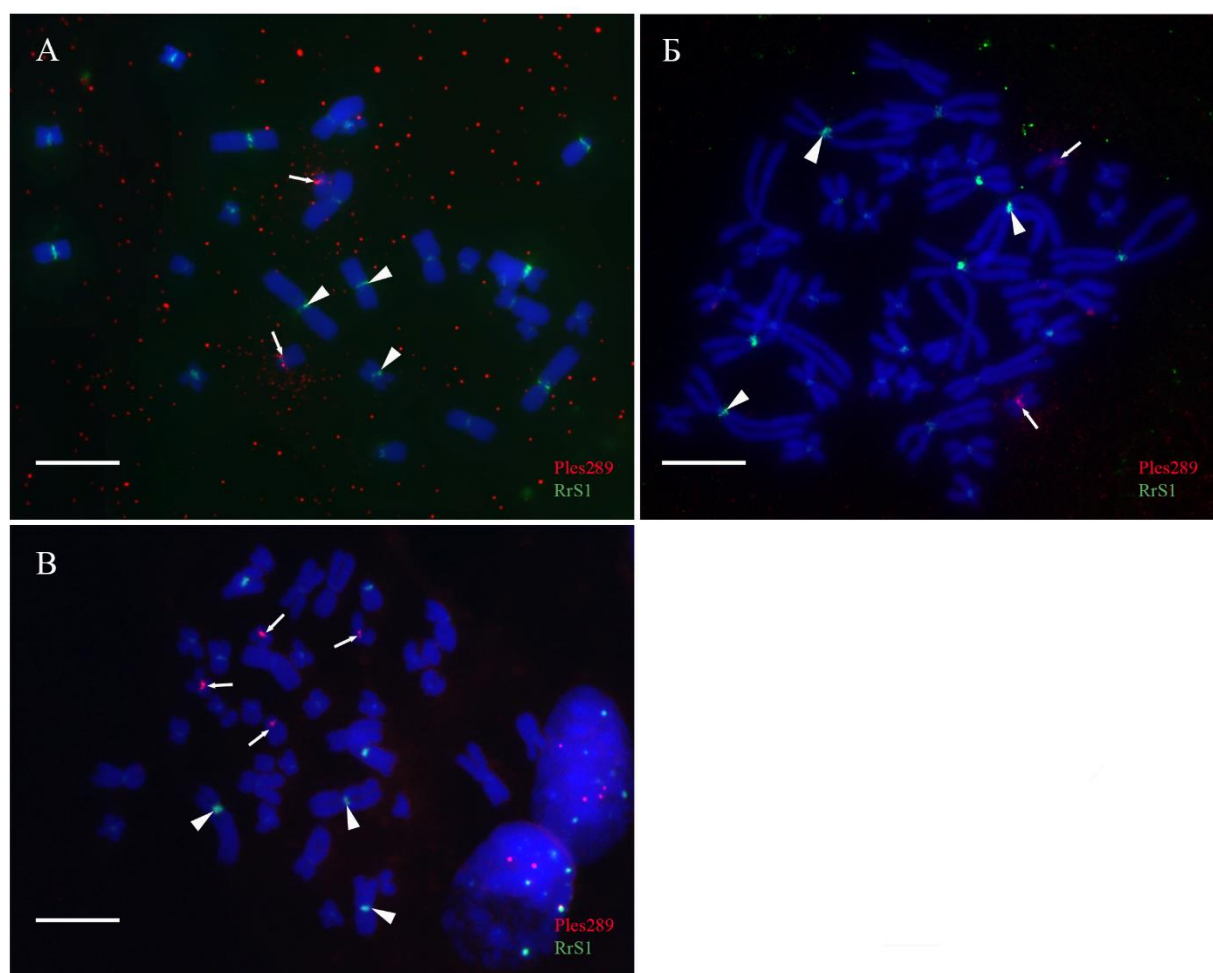


Рис. 3.2. Визначення видової приналежності особин з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перичентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перичентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний). Мітотичні метафази з тканин кісткового мозку гібридів: А) 26 хромосом диплоїдного *P. esculentus* (геном

LR); 39 хромосом триплоїдного *P. esculentus* – Б) геном LRR, В) геном LLR. Стрілки вказують на хромосоми, мічені зондом Ples289, наконечники стрілок вказують на хромосоми, мічені RrS1. Масштабна шкала = 10 мкм

Щоб оцінити потенційну стерильність гібридних самців, ми виміряли їх сім'яники. Лівий і правий сім'яники шести диплоїдних гібридів (№434, 435, 436, 19I-60, 19I-62, 19U-4) були однаковими, тоді як у 40 самців (як ди-, так і триплоїдних) лівий сім'яник був більшим (лівий - середнє 4,9 мм; правий - середнє 4,6 мм) для шести самців проміри сім'яників зробити не вдалось (Додаткова табл. 3). Чотири триплоїдні самці значуще не відрізнялися від диплоїдних гібридів ні за розміром тіла (SVL), ні за розміром сім'яників (Додаткова табл. 3). Сім'яники гібридів мали округлу форму без будь-яких видимих аномалій. Різниця в розмірах сім'яників є звичайною для *P. esculentus* і може супроводжуватися зниженням фертильності (Berger, 1970; Ogielska & Bartmańska, 1999).

Після цього, використовуючи FISH з видоспецифічними зондами, ми визначили склад геному сперматоцитів I (біваленти) і II (уніваленти) порядку. Ми ідентифікували метафази під час мейозу I і II і сперматиди лише з сигналами RrS1 як клітини з геномом *P. ridibundus* (наприклад, Рис. 3.3, тонка стрілка), а ті, що мають лише сигнали Ples289, як клітини з геномом *P. lessonae* (наприклад, Рис. 3.4, наконечник від стрілки). Якщо сперматиди мали один або три сигнали Ples289, ми ідентифікували їх як анеуплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*, а сперматиди з чотирма сигналами Ples289 ми ідентифікували як диплоїдні сперматиди з подвійним геномом *P. lessonae* (наприклад, Рис. 3.7E, тонка стрілка). На основі отриманих результатів ми припустили, які гамети виробляли гібридні самці (Додатковий рис. 1; Додаткові табл. 4, 5, 6), описали шляхи їх гаметогенезу (Рис. 4.1) та оцінили їхній внесок у відтворення популяційної системи (Рис. 4.2, Додатковий рис. 5).

3.2.1. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців Іськова ставу з використанням тільки зонду із послідовністю RrS1

Аналіз інтерфазних ядер одного самця (19I-60) виявив як інтерфазні клітини без сигналів, так і клітини з сигналами RrS1 (Рис. 3.3К). Таким чином, деякі клітини мали хромосоми тільки з геномом *P. lessonae*, а деякі клітини мали принаймні один гаплоїдний геном *P. ridibundus*. Мітотичні метафазні пластинки цієї особини були представлені 26 хромосомами, де 13 хромосом мали геном *P. ridibundus*, а 13 хромосом мали геном *P. lessonae*. Також, ми зареєстрували пластинки із 26 хромосомами виключно з геномом *P. ridibundus*. Аналіз мейозу I чітко дозволив відрізнити 13 бівалентів тільки з геномом *P. ridibundus* (Рис. 3.3Л, М). Щоб утворити такі сперматоцити, геном *P. lessonae* повинен був бути премейотично елімінованим, тоді як геном *P. ridibundus* – ендореплікованим. Анеуплоїдні клітини (n=30) свідчать про недосконалу елімінацію геному та ендореплікацію. Аналіз сперматид (n=29) показав, що більшість сперматид мали геном *P. lessonae*, і лише деякі сперматиди мали геном *P. ridibundus* (Рис. 3.3М). Хоча ми зареєстрували як інтерфазні ядра, так і сперматиди виключно з геномом *P. lessonae*, ми не виявили мейотичних пластинок з бівалентами *P. lessonae*. Тому ми припускаємо, що сперматоцити з геномом *P. lessonae* мають бути присутніми у цієї особини, тобто самець був амфіспермічним з переважанням L-гамет серед продукованих клітин.

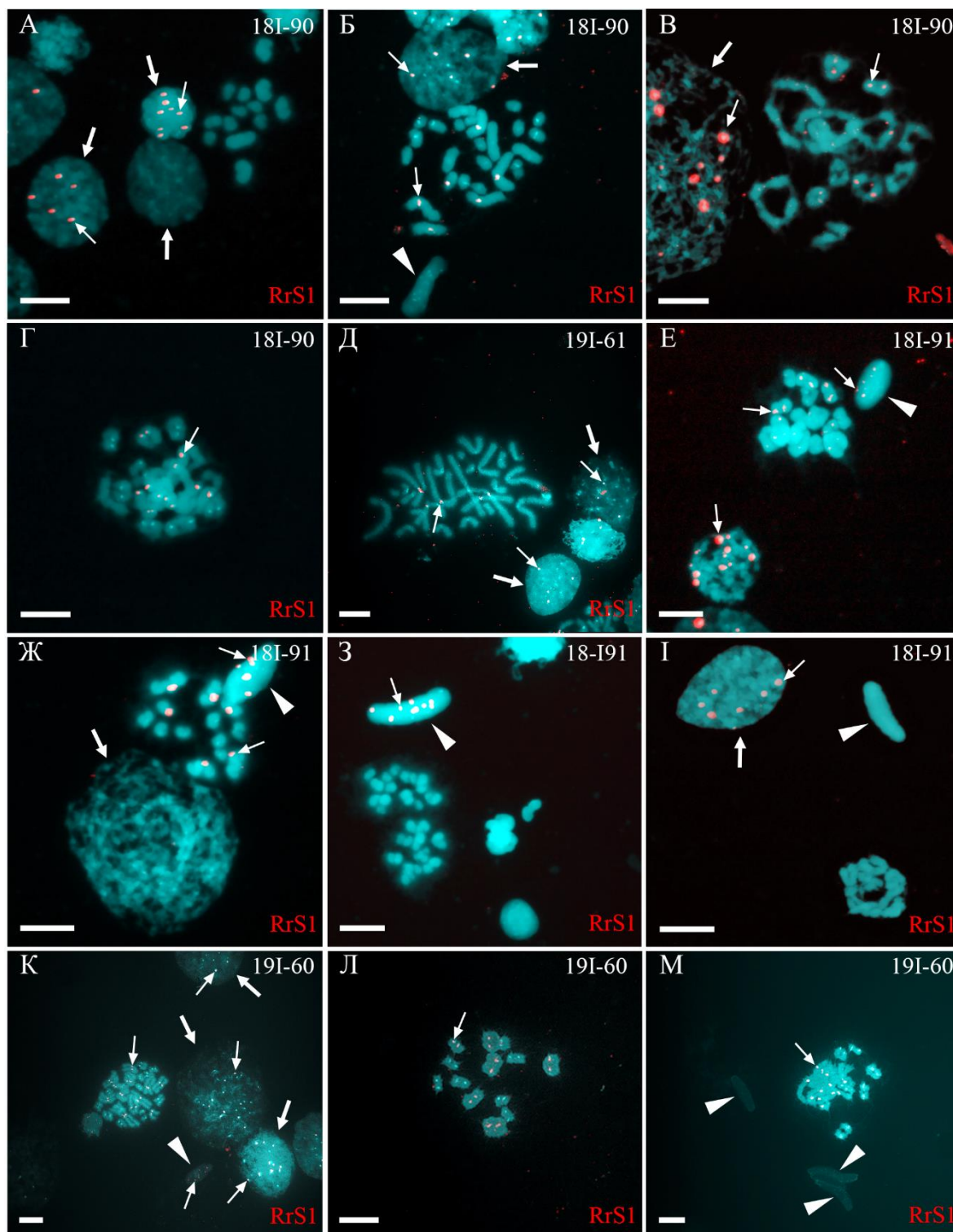


Рис. 3.3. Визначення плоідності та складу геному в сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* з Іського ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus*. FISH із зондом RrS1 дозволяє розрізнити перичентромерні ділянки лише хромосом *P. ridibundus* (позначено тонкими стрілками). (А-М) Соматичні клітини (А), сперматиди (Е-З), а також

сперматоцити в мейозі I (В, Г, Л, М) і II (Ж) мали лише хромосоми *P. ridibundus*, що свідчить про наявність премейотичної елімінації геному *P. lessonae* та ендореplikації геному *P. ridibundus*. Інтерфазні клітини (позначені товстими стрілками) з гаплоїдним набором хромосом *P. ridibundus* (А-В, Д, Е, І, К) і з хромосомами *P. lessonae* (А, З, І). А. Метафаза мейозу II (13 унівалентів) і ядра без сигналів RrS1; сперматида та ядра з сигналами RrS1. Б. Мітотична хромосомна пластинка ($2n=26$), сперматида та інтерфазні ядра з сигналами RrS1. В. Метафаза мейозу I (13 бівалентів) та інтерфазне ядро з сигналами RrS1. Г. Анеуплоїдна метафаза мейозу I (16 бівалентів). Д. Мітотична хромосомна пластинка ($2n=26$) та інтерфазні ядра з сигналами RrS1. Е. Метафаза мейозу I (13 бівалентів), сперматида та ядра з сигналами RrS1. Ж. Метафаза мейозу II (13 унівалентів) і сперматида з сигналами RrS1; ядро без сигналів RrS1. З. Сперматида з сигналами RrS1 і без них. І. Метафаза мейозу II (приблизно 13 унівалентів), сперматида без сигналів RrS1; ядро з сигналами RrS1. К. Мітотична хромосомна пластинка ($2n=26$), сперматида та інтерфазні ядра з сигналами RrS1. Л. Метафаза мейозу I (13 бівалентів) із сигналами RrS1. М. Метафаза мейозу I (приблизно 13 бівалентів) із сигналами RrS1; сперматида без сигналів. Масштабна шкала = 10 мкм

Аналіз інтерфазних ядер ($n=307$) двох самців (19I-62 та 18I-90) показав, що деякі інтерфазні ядра мають лише хромосоми *P. lessonae*, а інші – хромосоми *P. ridibundus* (Рис. 3.3А). Під час аналізу мітотичних метафаз ($n=44$) ми виявили метафазні пластинки з 26 хромосомами, які включали 13 хромосом *P. ridibundus* і 13 *P. lessonae*. Більшість сперматоцитів мали 13 бівалентів *P. ridibundus* (Рис. 3.3В, Г), тоді як лише деякі сперматоцити мали 13 бівалентів *P. lessonae*. Ми зареєстрували 58 анеуплоїдних хромосомних пластинок в обох самців. У мейозі II ми спостерігали сперматоцити з 13 унівалентами *P. ridibundus* і 13 унівалентами *P. lessonae* (Рис. 3.3А, Б).

Сперматиди ($n=114$) у цих самців були двох типів – з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, що підтверджує амфігаметність цих самців.

Аналіз інтерфазних ядер ($n=110$) у двох інших самців (18I-91 та 19I-61) виявив ядра виключно з хромосомами *P. lessonae* та ядра з хромосомами *P. ridibundus* (Рис. 3.3Д-Ж, І). Під час аналізу метафаз мітозу ($n=13$), отриманих від іншого самця (19I-61), ми знайшли метафазні пластинки з 26 хромосомами, серед яких 13 хромосом були з *P. lessonae* і 13 були з *P. ridibundus* (Рис. 3.3Д), а в одного з самців (18I-91) мітотичних хромосомних пластинок не було виявлено взагалі. Обидва самці одночасно виробляли сперматоцити з 13 бівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.3Е) і 13 бівалентами *P. lessonae*. Під час мейозу II ми виявили сперматоцити з 13 унівалентами *P. lessonae* (Рис. 3.3З) і з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.3Ж). У сперматидях кількість сигналів варіювала від 0 до 13. Сперматиди без сигналу вважалися такими, що несуть геном *P. lessonae* (Рис. 3.3І); сперматиди з 5-13 вважалися такими, що несуть геном *P. ridibundus* (Рис. 3.3Е, З). Ці два самці (18I-91, 19I-61) потенційно елімінували різні геноми в різних клітинах до мейозу і передали одночасно два геноми у своїх гаметах, таким чином ці самці є також амфігаметними.

3.2.2. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців Іськова ставку з використанням зондів RrS1 та Ples289

Аналіз 368 сперматид і 141 мейотичної метафази мейозу I і II від двох диплоїдних гібридних самців (№856, 857) показав наявність хромосом *P. ridibundus* або *P. lessonae* у всіх проаналізованих клітинах (Рис. 3.4). Під час мейозу I ми спостерігали метафази з 13 бівалентами геному *P. lessonae* ($n=19$) (Рис. 3.4Б) і метафази з 13 бівалентами *P. ridibundus* ($n=12$) (Рис. 3.4А).

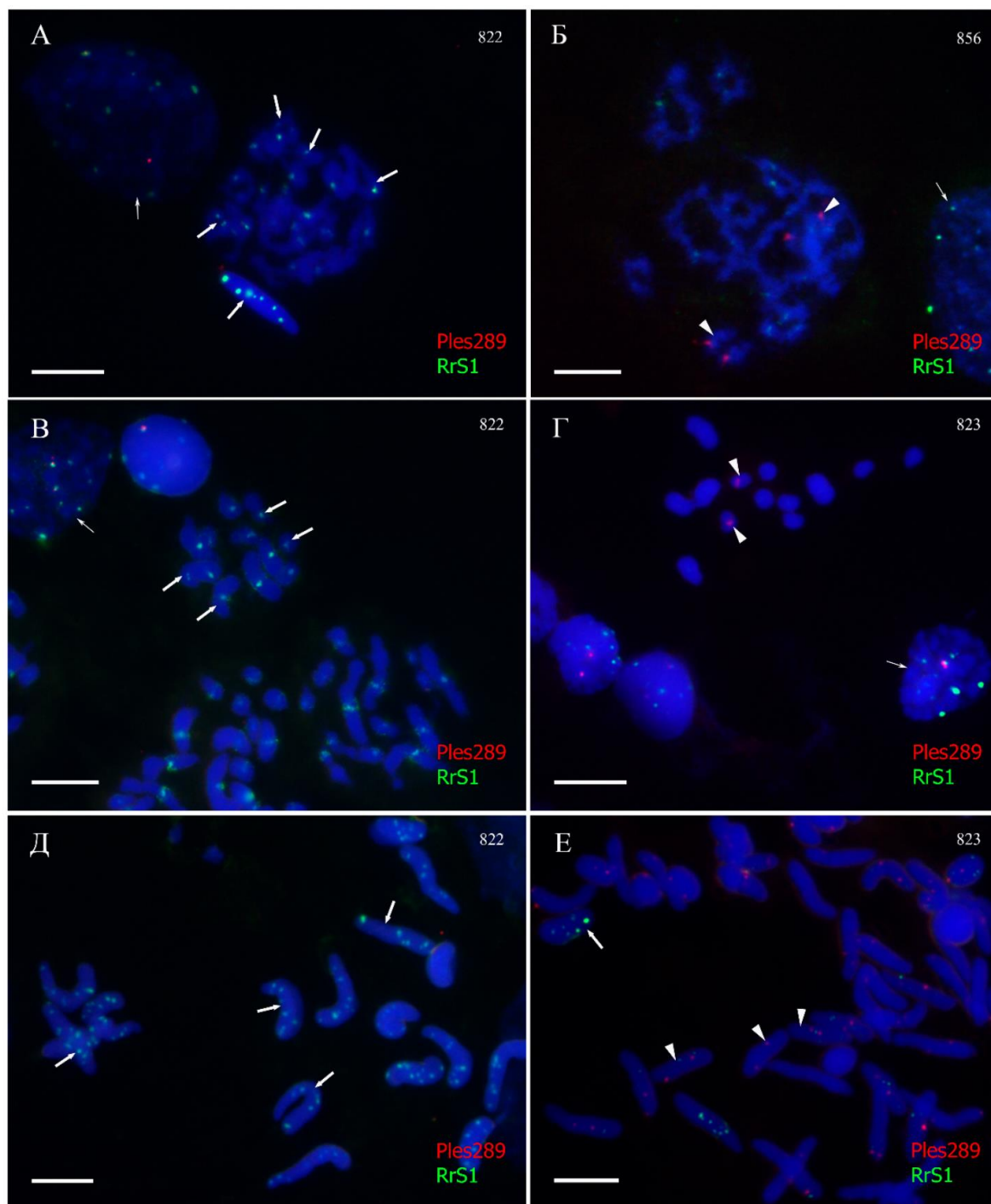


Рис. 3.4. Визначення плоїдності та складу геному в сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* з Іського ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перицентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перичентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний). Метафази в мейозі I (А, Б) з 13 бівалентами

P. ridibundus (А), 13 бівалентами *P. lessonae* (Б). Метафази в мейозі II (В, Г) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (В); 13 унівалентів *P. lessonae* (Г). Сперматиди *P. ridibundus* (А, Д, Е) і *P. lessonae* (Е). Стрілки в А, В, Д, Е вказують на мейотичні хромосоми та сперматиди з перичентромерним повтором *P. ridibundus*, наконечники стрілок у Б, Г, Е вказують на хромосоми та сперматиди з перичентромерним повтором *P. lessonae*; тонка стрілка в А-Г вказує на інтерфазні ядра з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Масштабна шкала = 10 мкм

Аналіз мейозу II виявив метафази з 13 унівалентами *P. lessonae* (n=47) (Рис. 3.4Г) і метафази з 13 унівалентами *P. ridibundus* (n=10) (Рис. 3.4В). Сперматиди цих самців мали геном *P. ridibundus* (n=248), геном *P. lessonae* (n=115), а також були анеуплоїдними з геномом *P. lessonae* (n=4) (Рис. 3.4Е). Ми припускаємо, що самці були амфіспермічними, оскільки вони виробляли гаплоїдні сперматиди з геномом *P. ridibundus* і гаплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*.

3.2.3. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців р. Мож 1) з використанням тільки зонду із послідовністю RrS1

Аналіз 436 інтерфазних ядер від чотирьох диплоїдних гібридних самців (17Т-5, 17Т-10, 18Т-8, 18Т-7) показав наявність інтерфазних ядер із 3–18 сигналами (Рис. 3.5В-Д) разом з інтерфазними ядрами без сигналів (Рис. 3.5Г). Ядра з 5–13 сигналами містили принаймні гаплоїдний набір хромосом *P. ridibundus*, тоді як ядра з понад 13 сигналами містили анеуплоїдний або диплоїдний набір хромосом *P. ridibundus*. Аналіз 79 метафазних мітотичних пластинок показав 0–24 сигнали, серед яких більшість метафазних пластинок мали 12–13 сигналів (Рис. 3.5Д). Ці результати добре узгоджуються з результатом аналізу інтерфазних ядер, припускаючи принаймні три популяції клітин: клітини з 26 хромосомами *P. lessonae*, клітини з 13 хромосомами

P. ridibundus і 13 *P. lessonae* та клітини з 26 хромосомами *P. ridibundus*. Відрізнити статеві клітини від соматичних, використовуючи тільки один із зондів - важко. Однак, оскільки елімінація геному та ендореplikація відбуваються лише в статевих клітинах, ми розглядали клітини з хромосомами *P. lessonae* як статеві клітини. Під час мейозу I ми спостерігали сперматоцити з 13 бівалентами *P. ridibundus* і сперматоцити з 13 бівалентами *P. lessonae* у всіх чотирьох проаналізованих самців (Рис. 3.5А, В, Г, Е, Ж, К). У двох із цих самців (18Т-7, 17Т-10) домінували біваленти з хромосомами *P. ridibundus* (87% і 77%). Під час мейозу II ми виявили сперматоцити з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.5Б) і 13 унівалентами *P. lessonae* (Рис. 3.5І). Крім того, ми спостерігали багато аберантних клітин у всіх проаналізованих самців. Спостережувані гібриди потенційно елімінували різні геноми в різних клітинах до мейозу або мали проблеми з селективною елімінацією. Ми виявили сперматиди, в яких сигнал послідовності *P. ridibundus* змінювався від 0 до 12, що свідчить про наявність сперматид у геномах *P. lessonae* та *P. ridibundus* (Рис. 3.5Б-Г, К). Ці самці передали у своїх клітинах одночасно два батьківські геноми, тобто були амфігаметними.

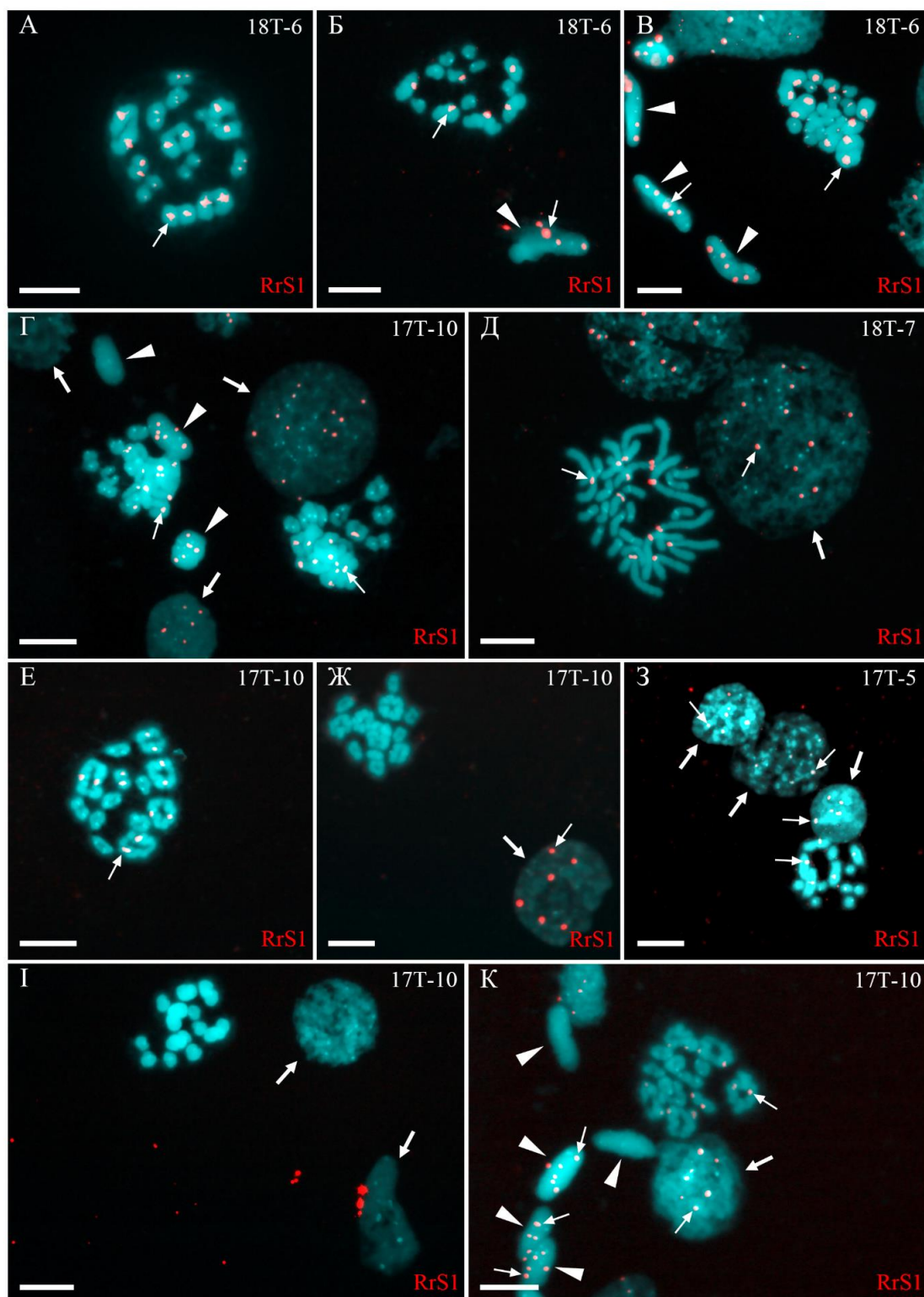


Рис. 3.5. Визначення плоідності та складу геному в гоноцитах, сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* із заплави річки Мож з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus*. А. Метафаза мейозу I (13 бівалентів) з сигналами RrS1. Б. Метафаза мейозу II (13

унівалентів), сперматида з сигналами RrS1. В. Метафаза мейозу I (13 бівалентів), сперматиди та інтерфазні ядра з сигналами RrS1. Г. Метафази мейозу I (13 бівалентів), інтерфазні ядра з сигналами RrS1, сперматида без сигналу RrS1. Д. Мітотична хромосомна пластинка ($2n=26$) та інтерфазні ядра з сигналами RrS1. Е. Метафаза мейозу I (13 бівалентів) з сигналами RrS1. Ж. Метафаза мейозу I (13 бівалентів) без RrS1 сигналів; інтерфазне ядро з сигналами RrS1. З. Метафаза мейозу II (13 унівалентів) і інтерфазні ядра з сигналами RrS1. І. Метафаза мейозу II (13 унівалентів) і інтерфазні ядра без сигналів RrS1. К. Метафази мейозу I (13 бівалентів), інтерфазні ядра, сперматиди з сигналами RrS1, сперматиди без сигналу RrS1. Масштабна шкала = 10 мкм.

П'ятдесят чотири досліджені інтерфазні клітини одного самця (18-Т6) мали принаймні п'ять сигналів, що вказує на наявність гаплоїдного геному *P. ridibundus* (Рис. 3.5В). Аналіз 14 мітотичних хромосомних пластинок показав 8 пластинок з 26 хромосомами, з яких 13 належали *P. ridibundus* і 13 *P. lessonae*, інші шість мітотичних хромосомних пластинок були анеуплоїдними. Під час аналізу 32 метафаз мейозу I ми виявили 13 бівалентів *P. ridibundus* (Рис. 3.5А). Ми також виявили п'ять метафаз мейозу II з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.5Б). Крім того, було зареєстровано 24 анеуплоїдні хромосомні пластинки. Проаналізовані сперматиди ($n = 48$) продемонстрували виключно присутність хромосом *P. ridibundus* (Рис. 3.5В). Ми припускаємо, що під час гаметогенезу у цього самця геном *P. lessonae* був премейотично елімінований з подальшою ендореплікацією геному *P. ridibundus*.

У однієї особини (17Т-8) ми спостерігали інтерфазні ядра з 3–26 сигналами (Рис. 3.6А, Б, Г, Д). Скоріше за все, в клітинах з 5-13 сигналами був гаплоїдний геном *P. ridibundus*; диплоїдний геном *P. ridibundus* вірогідно був у клітинах із 15–26 сигналами. Аналіз 14 мітотичних хромосомних

пластинок цієї особини показав 3 мітотичні хромосомні пластинки з приблизно 52 хромосомами, включаючи хромосоми тільки *P. ridibundus* (Рис. 3.6Б) і хромосоми тільки *P. lessonae* (Рис. 3.6В). У 8 метафазних пластинках ми спостерігали 26 хромосом, які мали геном *P. ridibundus* (Рис. 3.6Г), а також хромосоми *P. ridibundus* і *P. lessonae* (Рис. 3.6І). У мейозі I ми виявили хромосомні пластинки з 13 тетравалентами *P. ridibundus* і метафазні пластинки з 13 тетравалентами *P. lessonae* (Рис. 3.6Д, Ж) (23% від загальної кількості). Один із геномів був видалений для утворення сперматоцитів із специфічними для генома тетравалентами, тоді як інший пройшов два раунди ендореплікації геному. Ми також знайшли метафазні пластинки мейозу I з приблизно 13 тетравалентами, включаючи 26 хромосом *P. ridibundus* і 26 хромосом *P. lessonae* (Рис. 3.6Е). Сперматиди цього самця мали 3–19 сигналів, що свідчить про наявність двох геномів *P. ridibundus* принаймні в деяких сперматидах (Рис. 3.6Е-З). Результати отримані від цього самця також підтверджують його властивість продукувати гамети різного геному одночасно (амфігаметність).

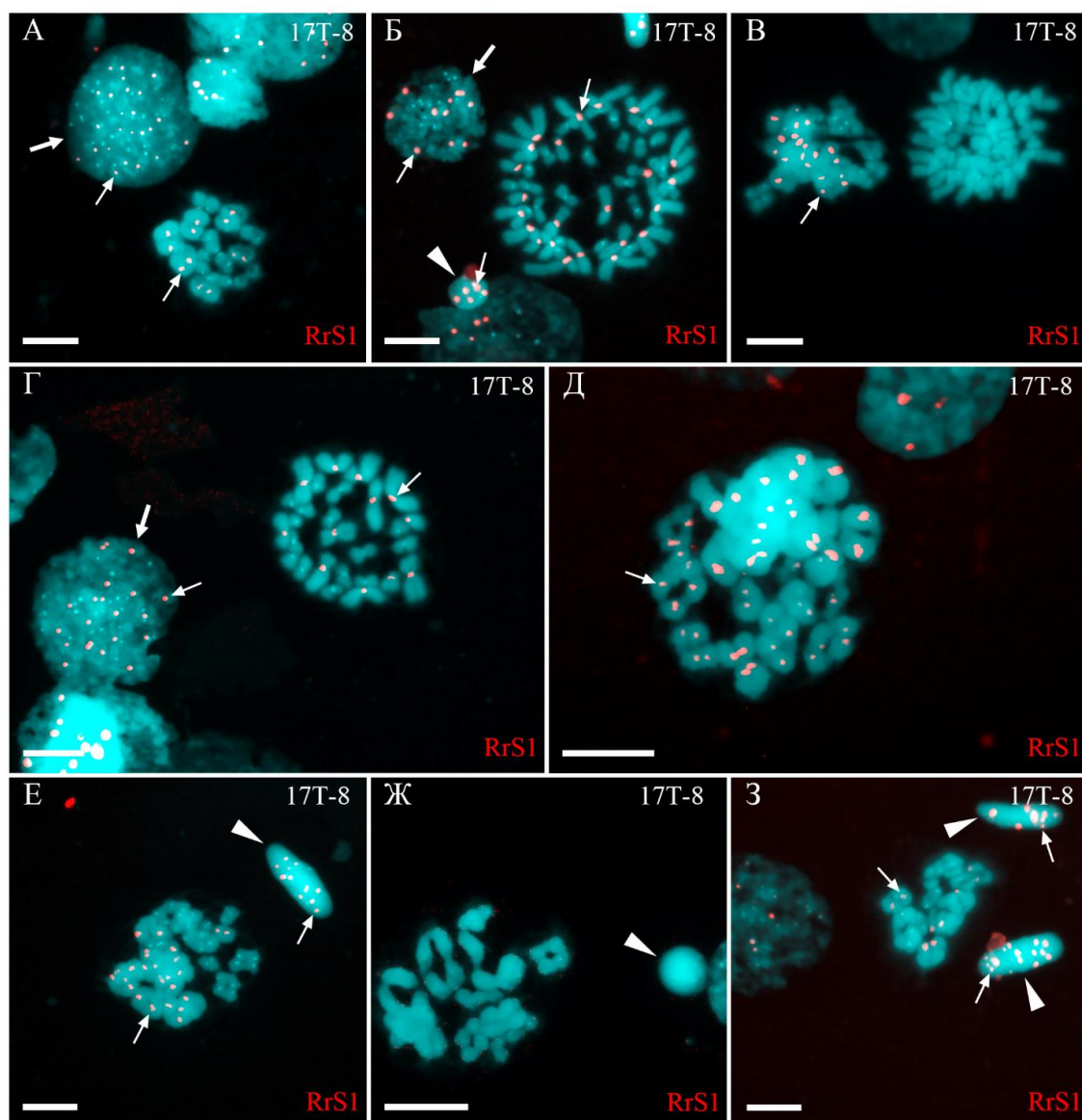


Рис. 3.6. Визначення плоідності та складу геному в гоноцитах, сперматоцитах і сперматидах у самця *P. esculentus* (№17Т-8), який продукував диплоїдні сперматиди, із заплави річки Мож з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus*. Ядра інтерфазних клітин (позначено товстими стрілками) з диплоїдним набором хромосом *P. ridibundus* (А, Г). Мітотичні метафази з 26 хромосомами *P. ridibundus* (Г), приблизно 47 хромосомами *P. ridibundus* (Б) і з приблизно 40 хромосомами *P. lessonae* (В). Метафаза мейозу I з 13 бівалентами *P. ridibundus* (А), приблизно 12 тетравалентами (або сумішшю бівалентів і тетравалентів) з виключно хромосомами *P. ridibundus* (Д) і з приблизно 11 тетравалентами з виключно хромосомами *P. lessonae* (Ж). Метафаза мейозу I з сумішшю

приблизно 9 тетравалентів *P. lessonae* і 4 бівалентів *P. lessonae*, а також 4 тетравалентів *P. ridibundus* і 4 бівалентів *P. ridibundus* (Е). Сперматиди (показані стрілками) щонайменше з 5 хромосомами *P. ridibundus* (позначені як гаплоїдний геном *P. ridibundus*) (Б, З), лише з хромосомами *P. lessonae* (позначені як гаплоїдний або диплоїдний геном *P. lessonae*) (Ж) і щонайменше 14 хромосомами *P. ridibundus*, і щонайменше 17 хромосомами *P. ridibundus* (позначаються як диплоїдний геном *P. ridibundus*) (Е, З). Хромосоми *P. ridibundus* ідентифіковані за допомогою перицентромерного повтору RrS1 на основі FISH (позначено тонкими стрілками). Масштабна шкала = 10 мкм.

3.2.4. Аналіз гаметогенезу диплоїдних гібридних самців р. Мож 2) з використанням зондів RrS1 та Ples289

Ми проаналізували 254 сперматиди та 155 метафаз від двох диплоїдних гібридних самців (№823 і 822) (Рис. 3.7). В одного самця (№ 823) ми спостерігали дев'ять метафаз мейозу I із 13 бівалентами із геномом *P. lessonae* (Рис. 3.7Б). Аналіз мейозу II виявив 21 метафазу з 13 унівалентами *P. lessonae* та шість метафаз з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.7В, Г). Цей самець продукував сперматиди із геномом *P. ridibundus* ($n=25$), *P. lessonae* ($n=15$), а також анеуплоїдні із генотипом *P. lessonae* ($n=20$) (Рис. 3.7Д, Е). Оскільки цей самець мав сперматиди з геномами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, ми зробили висновок, що він був амфіспермічним. Інший самець (№822) продукував сперматиди ($n=193$) виключно з геномом *P. ridibundus* (Рис. 3.7Д). Крім того, ми спостерігали 16 метафаз мейозу I з 13 бівалентами *P. ridibundus* і 11 метафаз мейозу II з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Рис. 3.7А, В).

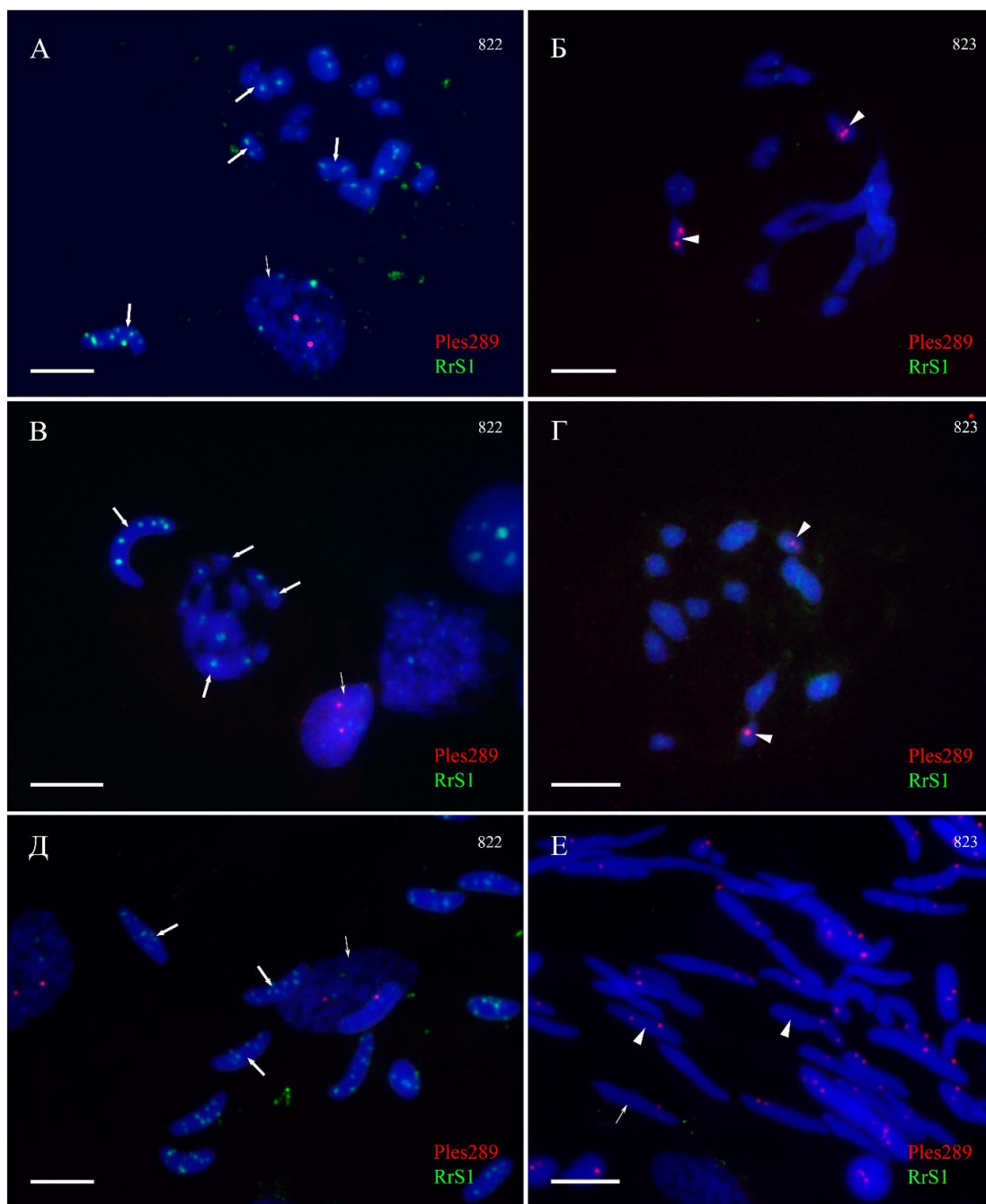


Рис. 3.7. Визначення плоідності та складу геному в сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* із заплави річки Мож з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перицентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перицентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний). Метафази в мейозі I (А, Б) з 13 бівалентами *P. ridibundus* (А), 13 бівалентами *P. lessonae* (Б). Метафази в мейозі II (В, Г) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (В); 13 унівалентами *P. lessonae* (Г).

Сперматиди *P. ridibundus* (А, В, Д) і *P. lessonae* (Е). Стрілки в А, В, Д вказують на хромосоми та сперматиди з перичентромерним повтором *P. ridibundus*, наконечники стрілок у Б, Г, Е вказують на хромосоми та сперматиди з перичентромерним повтором *P. lessonae*; тонкі стрілки в А, В, Д вказують на інтерфазні ядра з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*; тонкі стрілки в Е позначають анеуплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*. Масштабна шкала = 10 мкм

3.2.5. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців Корякова ставку за допомогою FISH

Ми проаналізували 878 сперматид і 746 мейотичних метафаз від семи гібридних самців (№866а, 824, 868, 585, 690, 688, 867). Два гібриди (№866а, 824) були триплоїдними з геномами LLR, інші були диплоїдними з геномом LR.

У трьох самців (№585, 690, 868) ми виявили сперматиди та мейотичні метафази з геномами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, що свідчить про те, що ці самці були амфіспермічними. Ми виявили метафази мейозу I з 13 бівалентами *P. lessonae* (n=77) (Рис. 3.8Б) і 13 бівалентами *P. ridibundus* (n=81) (Рис. 3.8А). В одного самця (№690) ми спостерігали метафази мейозу II з 13 унівалентами *P. lessonae* (n=7) (Рис. 3.8Д), 13 унівалентами *P. ridibundus* (n=37) (Рис. 3.8Г), а також знайшли 26 унівалентів *P. lessonae* (n=5) та 26 унівалентів *P. ridibundus* (n=6). Сперматиди цих трьох проаналізованих самців мали геноми *P. lessonae* (n=210), а також *P. ridibundus* (n=212) (Рис. 3.8Ж, З).

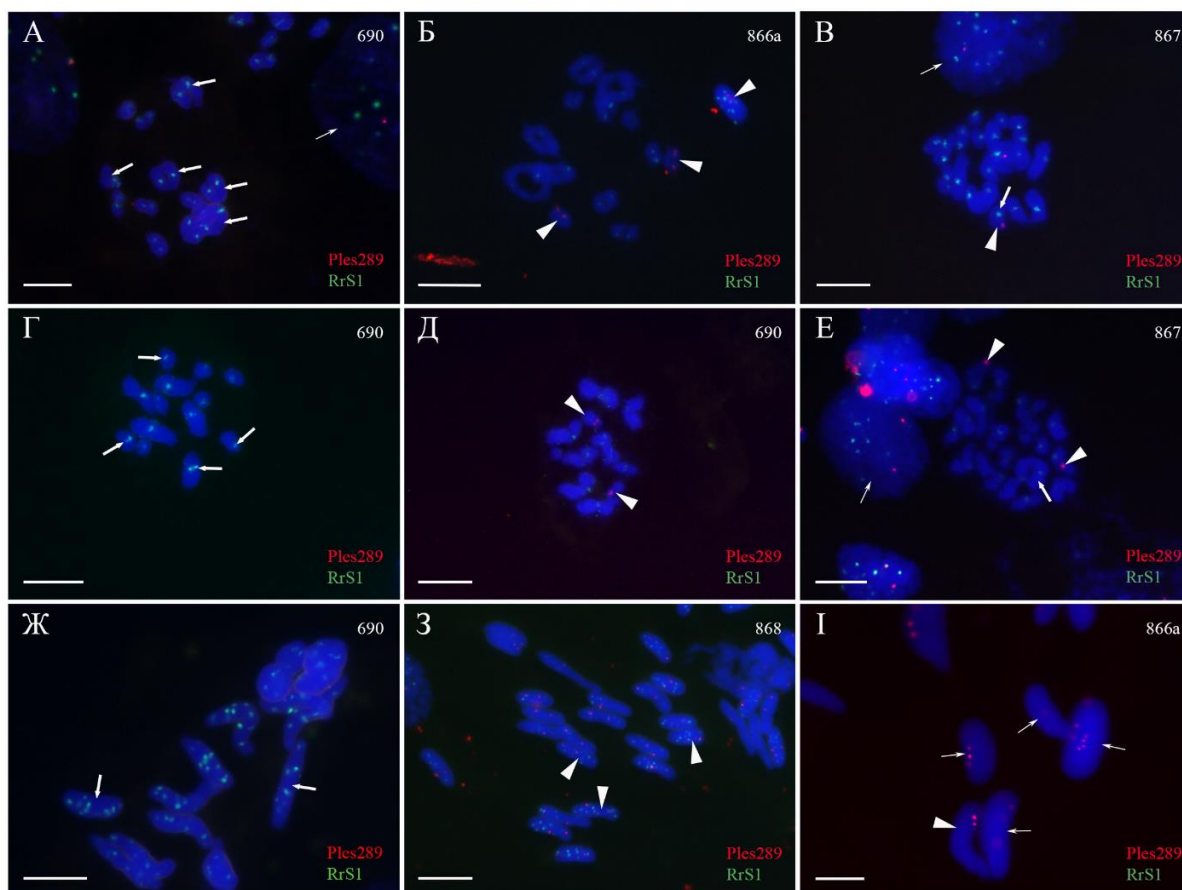


Рис. 3.8. Визначення плоїдності та складу геному в сперматоцитах і сперматидях самців *P. esculentus* із Корякова ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перицентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перичентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний). Метафази в мейозі I (А-В) з 13 бівалентами *P. ridibundus* (А), 13 бівалентами *P. lessonae* (Б) і кон'югованими хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae* (В). Метафази в мейозі II (Г, Д) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (Г); 13 унівалентів *P. lessonae* (Д). Метафаза з 26 унівалентами *P. ridibundus* і *P. lessonae* (Е). Сперматиди *P. ridibundus* (Ж) і *P. lessonae* (З, І). Стрілки в А, В, Г, Е, Ж вказують на перичентромерний повтор хромосом *P. ridibundus*, наконечники стрілок у Б, В, Д, Е, З, І вказують на перичентромерний повтор хромосом *P. lessonae*; тонкі стрілки в А, В, Е вказують на інтерфазні ядра з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*;

тонкі стрілки в I позначають анеуплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*.

Масштабна шкала = 10 мкм

Два гібриди (№688, 867) продукували сперматоцити лише з аномальною кон'югацією хромосом *P. lessonae* та *P. ridibundus*. Ми виявили 89 метафаз мейозу I з 13 бівалентами, утвореними між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae* (Рис. 3.8В, Е). Ми виявили 26 метафаз мейозу II з 13 унівалентами, які несуть один сигнал *P. lessonae* і 12 сигналів *P. ridibundus*. Аналіз сперматид самця №688 показав сперматиди з геномом *P. lessonae* ($n=12$), геномом *P. ridibundus* ($n=20$), а також анеуплоїдні сперматиди ($n=42$) (Рис. 3.8І). Додатково, у самця №867 ми виявили шість метафаз мейозу II з хромосомами *P. ridibundus* ($n=3$) і *P. lessonae* ($n=3$). Оскільки ми спостерігали нормальні сперматиди з геномами *P. lessonae* та сперматиди з геномом *P. ridibundus*, ми дійшли висновку, що самець №688 був амфіспермічним із великою кількістю аберантних клітин. 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.

В одного триплоїдного самця LLR (№866а) ми виявили метафази мейозу I з 13 бівалентами *P. lessonae* ($n=110$) (Рис. 3.8Б). Ми спостерігали одну метафазу з 13 унівалентами *P. lessonae* у мейозі II (Рис. 3.8Д). Крім того, ми знайшли три метафази з 26 унівалентами. Проаналізовані сперматиди ($n=280$) продемонстрували виключно присутність гаплоїдного набору *P. lessonae*. Ми також виявили сперматиди з чотирма сигналами зонда Ples289 ($n=6$) (Рис. 3.8І), що може свідчити про утворення диплоїдних LL гамет. Однак ми не виявили метафаз із подвоєним числом хромосом, щоб підтвердити це явище. Ми робимо висновок, що цей самець продукував гамети виключно з геномом *P. lessonae*.

Аналіз клітин сім'яників іншого триплоїдного гібрида LLR (№824) виявив наявність нормальних мейотичних метафаз, а також мейотичних

метафаз з аномальною кон'югацією між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*. У метафазі мейозу I ми виявили 13 бівалентів, утворених між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae* (n=18) (Рис. 3.8В). Ми додатково зареєстрували 26 унівалентів з хромосомами *P. lessonae* та *P. ridibundus* (n=26) (Рис. 3.8Е), 13 бівалентів *P. ridibundus* (n=4) та 26 унівалентів *P. ridibundus* (n=6) (Рис. 3.8Г). Метафаз мейозу I або II з геномом *P. lessonae* не виявлено. Аналіз сперматид показав наявність сперматид з геномом *P. lessonae* (n=18) (Рис. 3.8З), сперматид з геномом *P. ridibundus* (n=12) (Рис. 3.8Ж), а також анеуплоїдних сперматид (n=12) (Рис. 3.8І).

Ми також знайшли сперматиди з чотирма сигналами зонда Ples289 (n=3) (Рис. 3.8І), які можуть свідчити про утворення диплоїдних LL гамет. Таким чином, триплоїдний гібридний самець з генотипом LLR продукував різні типи сперматид з гаплоїдним геномом *P. ridibundus*, гаплоїдним геномом *P. lessonae*, вірогідно, із диплоїдним геномом *P. lessonae* і мав фракцію анеуплоїдних сперматид.

3.2.6. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців із Нижнього Добрицького ставу за допомогою FISH

Ми проаналізували 3697 сперматид та 1864 мейотичних метафаз від 30 гібридних самців. Четверо з них (826, 835, 23110, 2359) були триплоїдними зі складом геному LRR, двоє (2302, 2317) – триплоїдні зі складом геному LLR. Інші 23 самці (831, 829, 834, 832, 865а, 836, 357, 435, 355, 837, 438, 437, 434, 863, 440, 439, 654, 353, 436, 433, 830, 838, 828, 833) були диплоїдними з геномом LR.

Для одного самця (833) ми не зареєстрували ані сперматид, ані хромосом на склі. Отже, ми можемо припустити, що цей самець був повністю стерильним.

Під час аналізу мейозу I у дев'яти диплоїдних самців (440, 439, 654, 353, 436, 433, 830, 838, 828) ми виявили лише метафази з 13 бівалентами

P. ridibundus (n=318) (Рис. 3.9А) . Ми також виявили метафази мейозу II з 13 унівалентами *P. ridibundus* (n=160) (Рис. 3.9В). Крім того, ми знайшли 29 сперматоцитів з 26 унівалентами. Усі проаналізовані сперматиди (n=1066) мали хромосоми *P. ridibundus*, що свідчить про те, що всі ці самці продукували гамети з геномом *P. ridibundus* (Рис. 3.9Д).

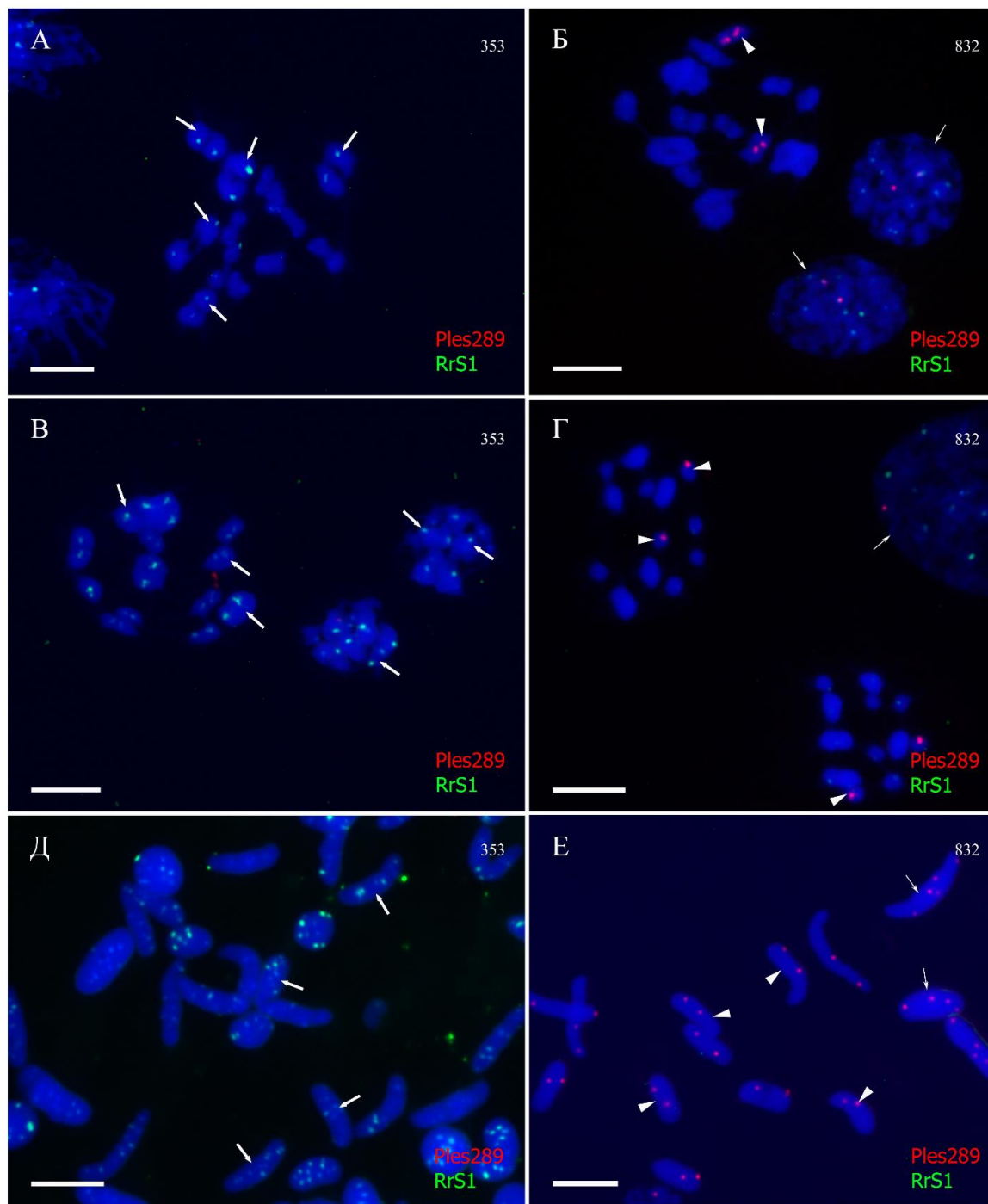


Рис. 3.9. Визначення плоїдності та складу геному в сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* із Нижнього Добрицького ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перицентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перицентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний).

Метафази в мейозі I (А-В) з 13 бівалентами *P. ridibundus* (А, В), 13 бівалентами *P. lessonae* (Б). Метафази в мейозі II (В, Г) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (В); 13 унівалентів *P. lessonae* (Г). Сперматиди *P. ridibundus* (Д) і *P. lessonae* (Е). Стрілки в А, В, Д вказують на хромосоми з перичентромерним повтором *P. ridibundus*, наконечники стрілок у Б, Г, Е вказують на хромосоми з перичентромерним повтором *P. lessonae*; тонка стрілка в Б, Г вказує на інтерфазні ядра з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*; тонка стрілка в Е вказує на потенційно диплоїдні сперматиди з подвійним геномом *P. lessonae*. Масштабна шкала = 10 мкм

Під час аналізу мейозу чотирьох диплоїдних гібридів (831, 829, 834, 832) ми виявили 13 бівалентів *P. lessonae* ($n=77$) у мейозі I (Рис. 3.9Б), а також виявили 13 унівалентів *P. lessonae* ($n=77$) у мейозі II (Рис. 3.9Г). Крім того, ми спостерігали сперматоцити з 26 унівалентами ($n=18$). У всіх проаналізованих сперматидах ($n=293$) ми спостерігали лише хромосоми *P. lessonae*, що свідчить про те, що всі проаналізовані самці продукували гамети лише з геномом *P. lessonae* (Рис. 3.9Е).

Аналіз мейозу десяти диплоїдних гібридів (865а, 836, 357, 435, 355, 837, 438, 437, 434, 863) виявив метафази мейозу I з 13 бівалентами *P. ridibundus* ($n=101$) і 13 бівалентами *P. lessonae* ($n=61$) (Рис. 3.9А, Б). Ми виявили сперматоцити мейозу I з 13 унівалентами *P. ridibundus* ($n=66$) і 13 унівалентами *P. lessonae* ($n=141$) (Рис. 3.9В, Г). Крім того, ми знайшли сперматоцити з 26 унівалентами з геномом *P. ridibundus* ($n=17$) та *P. lessonae* ($n=26$). Серед сперматид ми виявили як ті, що мають геном *P. ridibundus* ($n=1155$), так і ті, що мають геном *P. lessonae* ($n=449$). Ми виявили 40 сперматид з одним або трьома сигналами Ples289 (Рис. 3.9Е), що свідчить про їх анеуплоїдію. Ми припускаємо, що самці були амфіспермічними.

Аналіз клітин від чотирьох триплоїдних гібридів з геномом LRR (835, 826) виявив метафази мейозу I з 13 бівалентами *P. ridibundus* ($n=129$) і

метафази мейозу II з 13 унівалентами *P. ridibundus* (n=9). У всіх гібридів ми виявили сперматиди з геномом *P. ridibundus* (n=474). Крім того, ми спостерігали анеуплоїдні мейотичні сперматоцити з хромосомами *P. lessonae* (n=51) у гібридів №826 та №2359, а також анеуплоїдні сперматиди з одним або трьома сигналами Ples289 (n=34) (Рис. 3.9E). Тим не менш, ми припускаємо, що всі четверо LRR самців виробляли життєздатні гамети лише з геномом *P. ridibundus*, але в двох із них були порушення елімінації геному в клітинах, що призвело до анеуплоїдних сперматид з хромосомами *P. lessonae*.

Із двох триплоїдних самців з геномом LLR (№2302, 2317) лише один (№2302) продукував мейотичні сперматоцити I (n=27) та II (n=1), а також сперматиди (n=114) виключно з геномом *P. lessonae*. Ми припускаємо, що такий самець успішно видаляв геном R зі своїх клітин, передаючи лише L геном у гаметах.

Аналіз клітин сім'яників іншого триплоїдного гібрида LLR (№2317) виявив наявність нормальних мейотичних метафаз, а також мейотичних метафаз з аномальною кон'югацією хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae*. У метафазі мейозу I ми виявили пластинки із сумішню бівалентів, утворених між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, унівалентів як *P. ridibundus* так і *P. lessonae* (n=37) (Додатковий рис. 2А). Ми додатково зареєстрували анеуплоїдні пластинки з хромосомами *P. lessonae* (n=4) та *P. ridibundus* (n=4) (Додатковий рис. 2Б), а також одну метафазу мейозу II із 13 унівалентами *P. ridibundus*. Метафаз мейозу I або II з геномом *P. lessonae* не виявлено. Аналіз сперматид показав наявність сперматид з геномом *P. lessonae* (n=19), сперматид з геномом *P. ridibundus* (n=26), а також анеуплоїдних сперматид (n=25) (Додатковий рис. 2В).

3.2.7. Аналіз гаметогенезу самців з Нижнього Добрицького ставу за кількісним розподілом сперматид

Для того, щоб зрозуміти чи є зв'язок між кількістю продукованої сперми та стабільністю сперматогенезу, який визначався кількістю повних мейотичних метафаз (13 бівалентів для мейозу I, 13 унівалентів для мейозу II), ми виконали методику Ag-фарбування на препаратах сім'яників від 25 самців і проаналізували метафази мейозу та підраховували кількість повних (13 унівалентів або бівалентів), анеуплоїдних (менше або більше 13 унівалентів або бівалентів) і потенційно диплоїдних метафаз мейозу I з ± 26 бівалентами (Рис. 3.10).

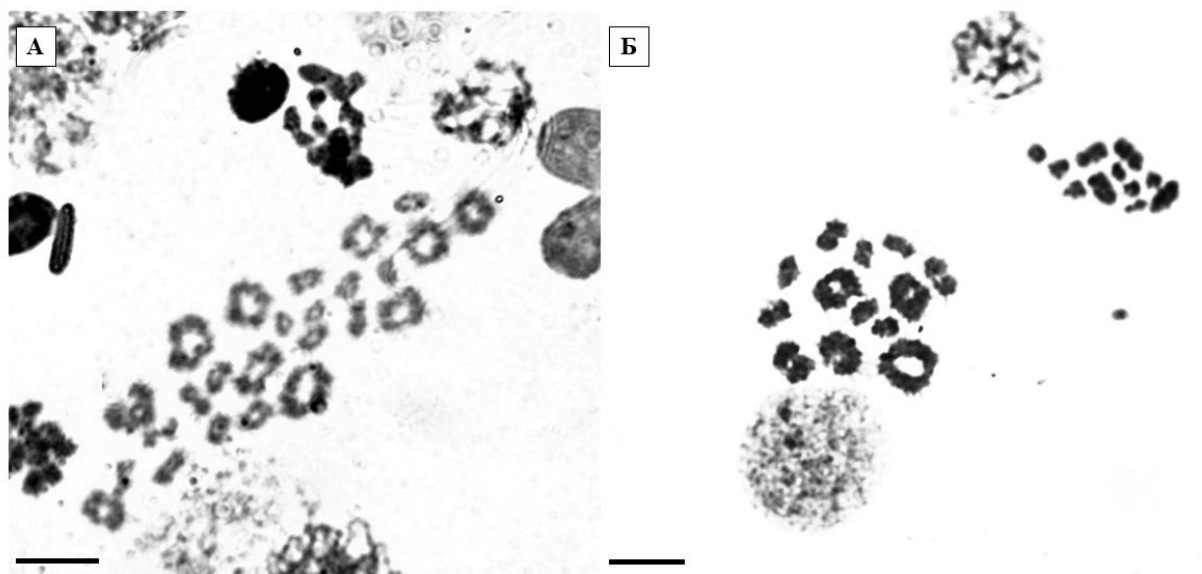


Рис. 3.10. Мейотичні метафази з сім'яників гібридних самців *R. esculentus* з Нижнього Добрицького ставу після Ag-фарбування. А) тетраплоїдна метафаза мейозу I, 26 бівалентів; Б) диплоїдна метафаза мейозу I, 13 бівалентів. Масштабна шкала = 10 мкм

Ми не аналізували мітотичні хромосомні пластинки із сім'яників, оскільки методом срібління неможливо розрізнити соматичні та зародкові мітози. Загалом ми проаналізували 1362 метафаз мейозу (~55 на жабу). З 24 самців 23 мали від 32 до 100% повних мейотичних метафаз на стадії I або II, і

лише один (№833) не мав їх взагалі, що може свідчити про стерильність цього самця. Також, десять самців (№ 836, 351, 353, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439) продукували від 1 до 17% метафаз мейозу I із ± 26 бівалентами, що може бути ознакою продукування диплоїдних гамет. На підставі даних підрахунку мейотичних хромосом ми провели аналіз головних компонентів і розподілили всіх досліджених жаб на п'ять категорій (Рис. 3.11).

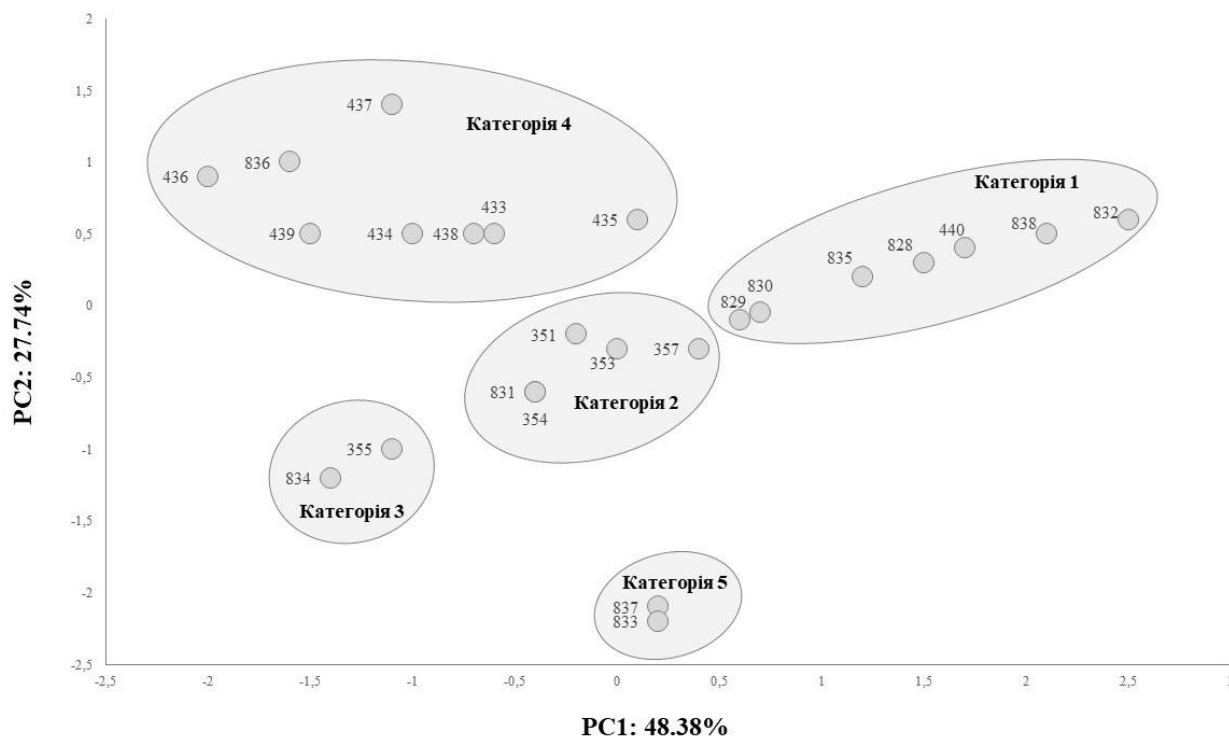


Рис. 3.11. Результати аналізу головних компонент. Різниця між самцями визначалася за кількістю повних (13 бі-/унівалентів) та неповних (число бі-/унівалентів не кратне 13) метафаз мейозу, а також за кількістю метафаз з ± 26 бівалентами. Далі самців розподіляли за категоріями: категорія 1 – більшість гаплоїдних мейотичних метафаз мають повну кількість уні- ($n=13$) або бівалентів ($2n=26$); категорія 2 – співвідношення повних і анеуплоїдних мейотичних метафаз близьке до 1:1; категорія 3 – більшість мейотичних метафаз анеуплоїдні (більше або менше 13 уні- або бівалентів); категорія 4 – значна кількість мейотичних метафаз з ± 26 бівалентами; категорія 5 – мейотичних метафаз не знайдено.

У 11 самців, спійманих влітку 2020 і 2021 років, ми також зібрали зразки уринальної сперми та виміряли тільки довжину голівок сперматозоїдів, оскільки хвости відпадають під час фіксації у розчині Карнуа. Серед 11 досліджених жаб десять мали кількість сперми, достатню для вимірювання (Додаткова табл. 3). У зразку одного самця (№833) взагалі не було сперми. Загалом ми проаналізували 962 сперматозоїди для десяти самців *P. esculentus*. Щоб оцінити продуктивність кожного самця, ми приблизно оцінили середню кількість сперматозоїдів у краплях суспензії сперми (~50 мкл) на предметних скельцях. Якщо кількість сперматозоїдів перевищувала 1000, такі самці вважалися високопродуктивними, ті, у кого їх було 100-1000, відзначалися як помірнопродуктивні, а <100 — як низькопродуктивні.

Частки жаб, віднесених до кожної категорії, відрізнялися між старими (2016-2017) і новими (2020) вибірками ($p = 0,019$, $\chi^2 = 6,925$). Більшість самців, виловлених у 2020-2021 роках, були віднесені до категорії I. Чотири з шести самців категорії I мали високу або помірну кількість сперматозоїдів у зразках сечі. Крім того, помірні кількості були виявлені у зразках самців, віднесених до категорій II, IV і V. Хоча категорія IV характеризувалася наявністю пластинок з 26 бівалентами, єдина особина з цієї категорії, для якої ми виміряли розмір сперми, мала однакову кількість повних і анеуплоїдних мейотичних пластинок, що характерно для II категорії.

Оскільки розмір клітин напряму пов'язаний із кількістю ДНК, яка міститься у клітині, ми співставили розмір сперматозоїдів із плоідністю мейотичних метафаз для вибірки самців 2021 року (№828-838), щоб зрозуміти, чи можливо за розміром сперматозоїда сказати про його плоідність. Тільки один самець (№836) продукував метафази із 26 бівалентами, але розміри його сперматозоїдів значуще не відрізнялись від середньої довжини інших десяти самців, крім того, для цього самця було помірно малу кількість сперматозоїдів. Для того, щоб робити висновок про

зв'язок розміру сперматозоїда з його плоідністю, необхідно а) більша вибірка самців, для яких буде показана наявність мейотичних метафаз із 26 бівалентами і б) розробити метод фіксації сперматозоїдів, який передбачає збереження хвостової частини сперматозоїда для більш точних промірів.

3.2.8. Аналіз гаметогенезу диплоїдних та триплоїдних гібридних самців із Корякова та Нижнього Добрицького ставків із використанням CGH

Для того, щоб додатково перевірити, чи дійсно самці з Корякова та Нижнього Добрицького ставків (№824, 867) мали мейотичні пластинки з аномальною кон'югацією хромосом різних видів і з'ясувати причину цього феномену, ми виконали методику порівняльної геномної гібридизації (CGH) на препаратах хромосом кишечнику та сім'яників. CGH дозволяє чітко розрізнити всі хромосоми кожного з батьківських видів. У якості додаткового контролю, ми виконали дану методику на препаратах з сім'яників та кишківника від самця №828 з Нижнього Добрицького ставку, який за результатами FISH продукував лише гамети з R-геномом. Додатково, у якості контролю, ми виконали CGH на препаратах самця №866а з Корякова ставку, який за результатами FISH продукував лише гамети з L-геномом.

У результаті аналізу дев'яти мітотичних пластинок кишківника після CGH від контрольних самців, ми спостерігали 13 хромосом, які забарвлювалися у зелений колір, тобто відповідали геному *P. ridibundus*, і 13 хромосом, які забарвлювалися у червоний колір, тобто відповідали геному *P. lessonae*. Таким чином підтвердили, що обидва самці (№828, 866а) були диплоїдними з геномом LR (Рис. 3.12А). Ділянок хромосом, які зафарбовувалися б у інший колір, відмінний від кольору всієї хромосоми, ми не знайшли. Це свідчить про відсутність інтрогресії між геномами *P. ridibundus* та *P. lessonae*.

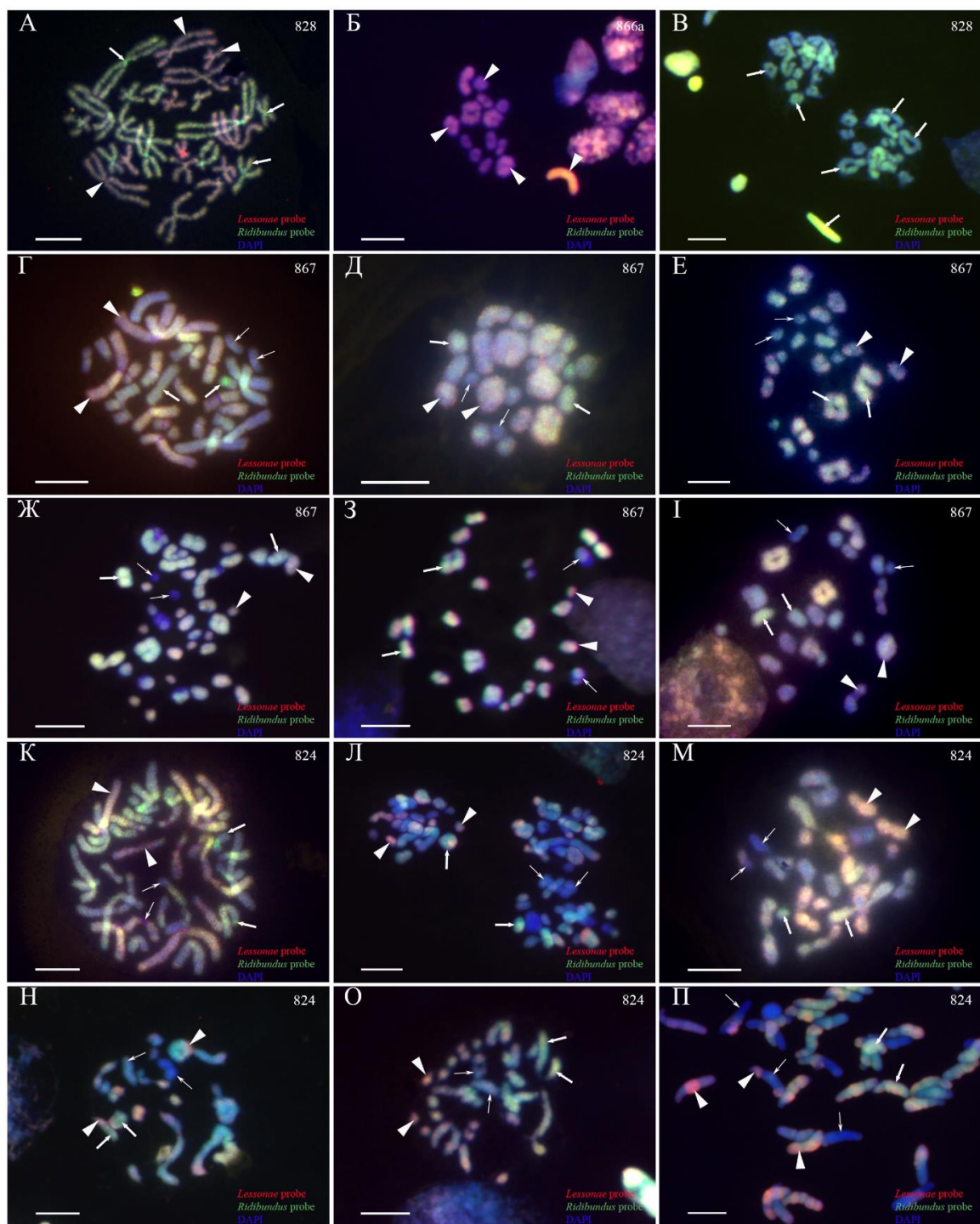


Рис. 3.12. Визначення складу геному в сперматоцитах і сперматидях самців *P. esculentus* із Нижнього Добрицького (А-В) та Корякова (Г-П) ставів за допомогою порівняльної гібридизації геномів (CGH). CGH дозволяє виявити хромосоми батьківських видів на препаратах з соматичних тканин (А, Г, К) та тканин сім'яників (Б, В, Д-І, Л-П) гібридних самців. Хромосоми (ділянки хромосом) які мають геном *P. ridibundus* забарвлюються у зелений

колір, хромосоми (ділянки хромосом) які мають геном *P. lessonae* забарвлюються у червоний колір, хромосоми (ділянки хромосом), забарвлені у синій колір (DAPI) мають невідомий геном, який відрізняється від геномів *P. lessonae* або *P. ridibundus*. Мітотична метафаза з тканин кишківника (2n=26) А) диплоїдного гібрида (LR геном) з Нижнього Добрицького ставу; Г) диплоїдного (2n=26) (№867) та К) триплоїдного (3n=39) (№824) гібридів з Корякова ставу із сумішшю геномів у каріотипі (L, R, невідомого). Мейотичні метафази та сперматиди виключно з геномом Б) *P. lessonae*, та В) *P. ridibundus*. Мейотичні метафази (Д-І, Л-О) та сперматиди (П) із сумішшю геномів у різних комбінаціях. Стрілки вказують на хромосоми або хромосомні ділянки, які містять геном *P. ridibundus*, наконечники стрілок вказують на хромосоми або хромосомні ділянки, які містять геном *P. lessonae*, тонкі стрілки вказують на хромосоми або хромосомні ділянки, з геномом, який відрізняється від відрізняється від геномів *P. lessonae* або *P. ridibundus*. Масштабна шкала = 10 мкм.

У результаті аналізу 37 мейотичних пластинок від контрольних самців, ми виявили, що усі мейотичні пластинки (n=20) та сперматиди (n=29) гібрида №866а забарвлювалися лише у червоний колір, який відповідав геному *P. lessonae*, тобто цей самець продукував гамети лише з L-геномом (Рис. 3.12Б). Усі мейотичні пластинки (n=17) та сперматиди (n=33) гібрида №828 забарвлювалися лише у зелений колір, який відповідав геному *P. ridibundus*, тобто цей самець продукував гамети лише з R-геномом (Рис. 3.12В). Таким чином патерн зафарбування хромосом після CGH відповідає результатам, отриманим за допомогою FISH.

Аналіз восьми мітотичних пластинок на препаратах із кишечника від диплоїдного самця з Корякова ставу (№867) виявив, що 13 його хромосом переважно забарвлювалися у зелений колір, який відповідав геному *P. ridibundus*, а 13 хромосом переважно забарвлювалися у червоний колір,

який відповідав геному *P. lessonae* (Рис. 3.12Д). Проте, на більшості хромосом ми спостерігали ділянки хромосом, забарвлені у колір, відмінний від кольору всієї хромосоми, а також ділянки, які зафарбовані одразу у обидва кольори, що відповідають двом різним геномам. Відмінні вставки та змішаний характер зафарбування може свідчити про рекомбінацію між двома геномами, або про інтрогресію одного з геномів у інший. Додатково, ми спостерігали частини хромосом, які не зафарбовувалися у жоден із кольорів, які б відповідали батьківському геному. Натомість, такі ділянки на мікрофотографіях хромосом зафарбовувалися тільки DAPI барвником майже на всіх хромосомах (тонка стрілка на Рис. 3.12Д). Ці незафарбовані ділянки можуть свідчити про інтрогресію третього геному у геноми як *P. lessonae*, так і *P. ridibundus*.

Аналіз клітин сім'яників виявив наявність мейотичних метафаз з аномальною кон'югацією хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Ми спостерігали метафази ($n=10$) із сумішшю бі- та унівалентів (Рис. 3.12Л-О). Згідно результатам отриманим за допомогою CGH, ми виділили сім окремих паттернів зафарбування хромосом в кожній мейотичній метафазі: 1) тільки зелені, які відповідали геному *P. ridibundus*; 2) тільки червоні, які відповідали геному *P. lessonae*; 3) сині – ті, які зафарбовувалися лише у DAPI-барвник і в яких не детектувався ані геном *P. ridibundus*, ані геном *P. lessonae*, 4) хромосоми, які неспецифічно зафарбовувались у зелений та червоний (тобто теоретично містили геноми *P. lessonae* + *P. ridibundus*), 5) зелений та синій (теоретично містили невідомий геном + геном *P. ridibundus*), 6) червоний та синій (тобто теоретично містили невідомий геном + геном *P. lessonae*), а також 7) такі хромосоми, які були зафарбовані у одразу три кольори, тобто містили в собі одночасно кожний з геномів (*P. lessonae* + *P. ridibundus* + невідомий геном). Загалом, для самця №867 ми не спостерігали специфічного паттерну зафарбування жодної з його пластинок (Додаткова табл. 6; Додатковий рис. 4А). У кожній із проаналізованих пластинок ми

спостерігали відсутність хромосом, зафарбованих у один із семи типів (Додаткова табл. 6). Метафаз у мейозі I або II виключно з геномом *P. lessonae* або *P. ridibundus* не було виявлено. Сперматид на препаратах сім'яників від самця №867 ми не знайшли.

Аналіз десяти мітотичних пластинок на препаратах із кишківника від триплоїдного самця з Корякова ставу (№824) виявив, що жодна з 39 хромосом не мала однотонного забарвлення у конкретний з кольорів, який би відповідав геному *P. ridibundus* або геному *P. lessonae* (Рис. 3.12Г). Проте, паттерн зафарбування хромосом був однаковий, на всіх хромосомах спостерігалися ділянки одного або іншого, або одразу обох геномів (Рис. 3.12Е-К), а також ділянки, які забарвлювалися лише DAPI. Така картина може означати присутність фрагментів геному третього виду у геномах *P. ridibundus* та *P. lessonae*, які передавалися у гаметах батьків цього самця. Аналіз клітин сім'яників виявив наявність мейотичних метафаз з аномальною кон'югацією хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Ми спостерігали метафази із сумішшю бі- та унівалентів ($n=6$), а також метафази із виключно бівалентами ($n=4$). Так само, як і у самця №867, ми виділили сім окремих паттернів зафарбування хромосом в кожній мейотичній метафазі. Проте, для самця №824 ми виокремили характерний паттерн, при якому найчастіше зустрічалися хромосоми, які мали одразу три кольори (47-100% від загальної кількості хромосом у кожній мейотичній метафазі), тобто містили в собі одночасно кожний з геномів (*P. lessonae* + *P. ridibundus* + невідомий геном) (Додатковий рис. 4). П'ять проаналізованих метафаз склалися виключно із бівалентів, п'ять із суміші бі- та унівалентів, проте жодного паттерну зафарбування характерного для метафаз із виключно бівалентами чи із сумішшю бі- та унівалентів не виявлено. Метафаз у мейозі I або II виключно з геномом *P. lessonae* або *P. ridibundus* не було виявлено. Ми також проаналізували сперматиди від цього самця ($n=67$) і виявили, що вони так само зафарбовувалися а) у три окремі кольори окремо або змішуючись ($n=35$)

(Рис. 3.12П, товста стрілка), б) у суміш червоного і синього ($n=3$) або 3) зеленого і синього ($n=15$) (Рис. 3.12П, наконечник стрілки), а також 4) тих, які зафарбовувалися лише ДАРІ-барвником ($n=14$) (Рис. 3.12П, тонка стрілка). Сперматид, які зафарбовувалися лише у зеленій або червоний кольори окремо, тобто містили тільки геном *P. lessonae* або *P. ridibundus*, не виявлено. Таким чином, у обох самців з порушеною кон'югацією хромосом, ми бачимо наявність сперматоцитів, які несуть у собі суміш із геномів обох видів, а у деяких випадках також, третього, невідомого.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Вклад гібридних самців у підтримку та відтворення гібридів у кожній із ГПС

4.1.1. ГПС Іськова та Нижнього Добрицького ставу

Ми виявили, що у Іскові та Нижньому Добрицькому ставках велику кількість становили самці, які продукували клітини як *P. ridibundus*, так і *P. lessonae*, тобто були амфіспермічними. Окрім того, попередні дослідження виявили як самців, так і самок, які продукували гамети лише одного типу (з геномом *P. lessonae* або геномом *P. ridibundus*) (Dedukh et al., 2015; 2017; Biriuk et al., 2016). Аналіз мейотичних метафаз показав, що серед сперматоцитів і сперматид, домінують ті, які мають геном *P. ridibundus*. Аналіз хромосом типу лампових щіток у самок *P. esculentus* показав, що диплоїдні самки з цих двох ГПС продукують гамети з геномом *P. ridibundus*, а триплоїдні самки LLR продукують диплоїдні гамети LR (Dedukh et al., 2015). Аналіз LDH-1 додатково підтвердив продукування диплоїдними самицями гамет з геномом *P. ridibundus*, а також показав можливість продукування гамет з геномом *P. ridibundus* самками LRR (Biriuk et al., 2016; Fedorova, Shabanov, 2022).

Незважаючи на велику кількість R-гамет, які виробляються як самцями, так і самками (Borkin et al., 2004; Biriuk et al., 2016; Pustovalova et al. 2022) і високу кількість *P. ridibundus* серед пуголовків (Fedorova, 2019; Fedorova et al., готується до публікації; неопубліковані дані), ми спостерігаємо досить низьку кількість *P. ridibundus* серед дорослих жаб. Причиною цього явища має бути селективна загибель гібридолітичних батьківських видів під час раннього розвитку і метаморфозу (що відбувається під час схрещування між самими гібридами або між гібридами та батьківськими видами (Günther, Plötner, 1988)), яка була показана для *Pelophylax esculentus* complex раніше (Vorburger, 2001; Reyer, Arioli-Jakob, Arioli, 2015).

Неодноразово робилося припущення, що наявність у особини двох клональних геномів може призвести до її загибелі на якомусь етапі розвитку (Vorburger, 2001; Shabanov et al., 2020). Однак, враховуючи високу варіабельність R-геномів у гібридних пуголовків і високе алельне багатство R-геномів у всіх проаналізованих пуголовків, деякі інші причини також повинні призвести до смерті більшості пуголовків *P. ridibundus*. Оскільки дорослі жаби здатні виробляти гамети з геномом *P. lessonae*, ми також повинні були очікувати побачити пуголовків *P. lessonae* у вивчених ГПС (Christiansen, Reyer, 2009). Відсутність таких пуголовків під час будь-яких проведених досліджень (Коршунов, 2010; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017) можна пояснити їхньою смертю на дуже ранніх стадіях розвитку (Reyer, Arioli-Jakob, Arioli 2015).

Підсумовуючи вищезгадані дані, ми бачимо, що утворення гамет з геномом *P. lessonae*, яке є необхідним для утворення гібридів, залежить лише від амфіспермічних самців, оскільки самців, які б продукували гамети із виключно *P. lessonae* геномом, було знайдено у мізерній кількості. Раніше, Шабановим Д. А. було висунуто припущення, що система Іськова ставу складається виключно із клонів, які утворюються за рахунок того, що і самки, і самці продукують гамети з обома геномами (=амфігаметність). Проте, нещодавні дослідження показали, що ця система складається із як мінімум дев'яти клональних ліній *P. lessonae*, окрім того, клональні лінії *P. ridibundus* є абсолютно унікальними для кожної проаналізованої жаби (Fedorova et al., готується до публікації). Протягом майже 10 років досліджень ГПС Іськова ставу, ми спостерігаємо стрімке зниження кількості триплоїдів, а також особин *P. ridibundus*. Ці дані свідчать про те, що в даній ГПС спостерігається вибіркова смертність деяких форм зелених жаб. Додатково, завдяки методу математичного моделювання раніше було показано, що через якийсь час ГПС Іськова ставу перейде у режим вимирання (Shabanov et al., 2020).

Попередні дослідження жаб із ГПС Іськова ставу демонструють, що висока смертність тварин спостерігалася після метаморфозу. Серед 31 жаби з ГПС Іськова ставу 68% були визначені за морфологією, як *P. ridibundus* (Макарян та ін., 2016), а згодом вид було підтверджено за допомогою FISH на клітинах із тканин кишечника (Fedorova et al., готується до публікації). Високий рівень смертності серед *P. ridibundus* спостерігався раніше для популяційних систем Північної та Центральної Європи. Було показано, що гібридолітичні особини часто демонструють аномалії розвитку і, у більшості випадків, гинуть, не досягнувши статевої зрілості (наприклад, Berger 1968, 1973; Guex et al., 2001; Plötner 2005; Reyer, Arioli-Jakob та Arioli 2015).

Додатково, висловлювалося припущення, що екологічні умови також можуть впливати на загибель окремих форм жаб в ГПС Іськова ставу (Fedorova et al., готується до публікації). Через постійне висихання Іськова ставу (Додатковий рис. 5) особини *P. ridibundus* не зимують, оскільки вони, як правило, впадають у сплячку під водою, що таким чином може призвести до їх загибелі (Berger, 1982; Berger, Rybacki, 1992, 1994; Semlitch, Reyer, 1992).

Ми виявили також високу частоту таких морфологічних аномалій, як ектромелія, гемімелія та таумелія серед метаморфів ГПС Добрицького ставу (Fedorova et al., 2023). Такі аномалії однозначно впливають на життєздатність жаб, оскільки серед дорослих особин частота зазначених аномалій була значно нижчою (Kryvoltsevych et al., 2022). На жаль, нам не вдалося ідентифікувати вид метаморфів, тому ми не можемо стверджувати, чи відіграють роль морфологічні аномалії у вибірковій загибелі нащадків. Вад розвитку можуть бути сигналом про погіршення стану ставків, будь-яких внутрішніх особливостей жаб або бути пов'язаними з інфекцією *Strigea robusta* (Svinin et al., 2020, 2023). Тим не менш, аномалії потребують підвищеної уваги та подальшого дослідження з використанням більш передових методів.

4.1.2. ГПС заплави р. Мож

У ході наших трирічних досліджень, ми вперше зареєстрували наявність триплоїдних гібридів *P. esculentus* у басейні річки Мож, де неодноразово проводили збір матеріалу, проте триплоїдів не знайшли (Коршунов, 2010; Шабанов, 2015; Бірюк, 2017). Для пояснення цього явища, ми пропонуємо три можливі гіпотези:

- 1) наявність триплоїдів у цій місцевості викликане міграцією зелених жаб (особливо *P. esculentus*, які можуть продукувати диплоїдні гамети) вище за течією р. Мож;
- 2) нововиникле в ході еволюції явище здатності продукувати диплоїдні гамети місцевими диплоїдними самцями та самками *P. esculentus*;
- 3) тривале існування триплоїдних *P. esculentus* у ГПС р. Мож, яке досі лишалось непоміченим.

І хоча для ГПС заплави р. Мож ми показали наявність одного самця, який продукував диплоїдні гамети з геномами RR, LL, LR у різному співвідношенні, ми не можемо ані підтвердити, ані спростувати другу гіпотезу, оскільки для цього необхідний довготривалий моніторинг, аналіз потомства та більш розширена вибірка гібридів для аналізу їх гаметогенеза. Найбільш можливим видається третій сценарій: усі досліджені раніше зразки з басейну річки Мож були нечисленними. Враховуючи те, що частка триплоїдів у заплаві р. Мож була досить невеликою у наших досліджених вибірках, можна припустити, що під час рандомного збору попередніх вибірок, триплоїди не трапились. Такий сценарій передбачає можливість існування (або регулярну появу) триплоїдів в інших диплоїдних системах (R-E-ГПС) у малих кількостях, які так само раніше не були виявлені. Тому інші системи, які раніше були класифіковані, як R-E-ГПС потребують повторної перевірки.

Система заплави р. Мож виявилася приблизно схожою за частиною триплоїдних гібридів, як і дві інші вже відомі системи в центрі Сіверського

Донця: Іськів і Коряків став. Ці системи також містять значну частину диплоїдних гібридів з нечисленними, але регулярно спостережуваними триплоїдами (зокрема, завдяки їх тривалому моніторингу) (роботи на Batrachos.com, Shabanov et al., 2020; Fedorova et al., готується до публікації). Співвідношення жаб із різною плоїдністю як у Коряківській, так і в Іськівській системах подібне до досліджуваної системи в р. Мож ($p = 0,438$ та $p \sim 1$ відповідно). Однак відомо, що ці дві системи також містять триплоїдних LRR, що вказує на їхню принципову відмінність від ГПС заплави р. Мож.

Загалом, трирічний моніторинг системи в річці Мож показав, що дуже високу частку вибірки становлять гібридні самці (Drohvalenko et al., 2021). Ймовірно, спостерігається висока вибіркова смертність серед самок, внаслідок того, що гамети, які мали геном *P. ridibundus* і *P. lessonae*, є клональними як у самців, так і у самок і дають потомство, яке гине в онтогенезі. Цю гіпотезу підтверджує зареєстрований високий рівень анеуплоїдних гамет, які продукують гібридні самці. Висока кількість таких гамет призводить до нестабільності системи та переведення її в режим вимирання (Shabanov et al., 2020). Робочою гіпотезою є те, що гібридні самки не трапились в ході наших ловів, хоча збір відбувався в середині або наприкінці нересту (травень - початок червня). У будь-якому випадку, система потребує подальших досліджень.

4.1.3. ГПС Корякова ставу

Завдяки десятирічному моніторингу ГПС Корякова ставу, ми з'ясували, що цю ГПС населяють переважно диплоїдні гібридні самці із невеликою часткою триплоїдних гібридів та особин батьківського виду (Рис. 9; Додаткова табл. 2). Порівнюючи Коряків став із Іськовим ставом, ми бачимо, що склад ГПС цих двох ставів значуще не відрізняється ($p=0.1$). Так само, ГПС Корякова ставу значуще не відрізняється від ГПС заплави р. Мож ($p=0.2$). Не дивлячись на це, гаметогенез гібридних самців з ГПС Корякова

ставу є дуже унікальним. По-перше, ми не знайшли жодного самця, який би продукував тільки гамети з геномом *P. ridibundus*. По-друге, наявність самців, які продукують лише гамети з геномом *P. lessonae*, а також тих, які є амфіспермічними, призводить до того, що частка гамет із геномом *P. lessonae*, які продукують гібриди у цьому ставі є найбільшою з усіх чотирьох проаналізованих систем. Здається, що ця система за типом відтворення є найбільш наближеною до канонного R-E типу, і тому ГПС Корякова ставу перебуває у стабільному стані, оскільки тут у повній мірі забезпечується відтворення гібридів (Рис. 3.1). Проте, ми зареєстрували тут самців, для яких ми знайшли велику кількість мейотичних пластинок із бівалентами, утвореними хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, що може свідчити про високий рівень рекомбінантних гамет, які до цього спостерігалися лише точково у віддалених локалітетах типу р. Одер (Doležálková et al., 2016; Doležálková-Kaštánková et al., 2018). Такі гамети, у випадку їх недосконалості, мали б призводити до того, що з кожним роком ми б спостерігали стрімке зниження чисельності ГПС, але ми бачимо, що частка кожної із форм є доволі стабільною кожного року, протягом десяти років досліджень. Це може бути свідченням того, що рекомбінантні особини гинуть під час онтогенезу. У випадку порушеного мейозу такі самці є низькофертильними, або навіть стерильними, зважаючи на той факт, що в одного з самців (№867) ми не знайшли сперматид взагалі.

Однак, виконавши CGH зафарбування хромосом із соматичних тканин, яке дозволяє помітити цілий геном того чи іншого виду, ми також бачимо, що частина хромосом у цих самців не забарвлюється у жоден із кольорів, що відповідав би геному *P. ridibundus* або *P. lessonae*. Ми можемо припустити наявність третього, невідомого, спорідненого геному, який інтрогресуючись, видозмінює обидва геноми таким чином, що хромосоми різних видів кон'югують між собою, утворюючи гамети із сумішшю хромосом різних видів, а отже і ознаками обох батьків. Проте, для підтвердження таких даних

необхідно провести більш глибокий аналіз ГПС Корякова ставу із точним визначенням складу геному кожної особини (наприклад шляхом RADseq), а також провести штучні схрещування жаб для отримання потомства і виявлення рекомбінантних особин.

4.2. Гібридогенез у гібридних самців із R-E-ГПС відрізняється від класичних гібридогенетичних шляхів

За допомогою ідентифікації складу геному в сперматоцитах і сперматидях ми детально описали шляхи гаметогенезу у гібридних самців з різних R-E-ГПС. Під час мейозу I ми виявили метафази з 13 бівалентами *P. ridibundus* і метафази з 13 бівалентами *P. lessonae*, що свідчить про те, що елімінація одного з геномів із зародкових клітин і ендореплікація іншого геному відбувається перед мейозом (Рис. 4.1). Після завершення мейозу спостережувані метафази з 13 бівалентами призводять до утворення редукованих гаплоїдних гамет (Рис. 4.1).

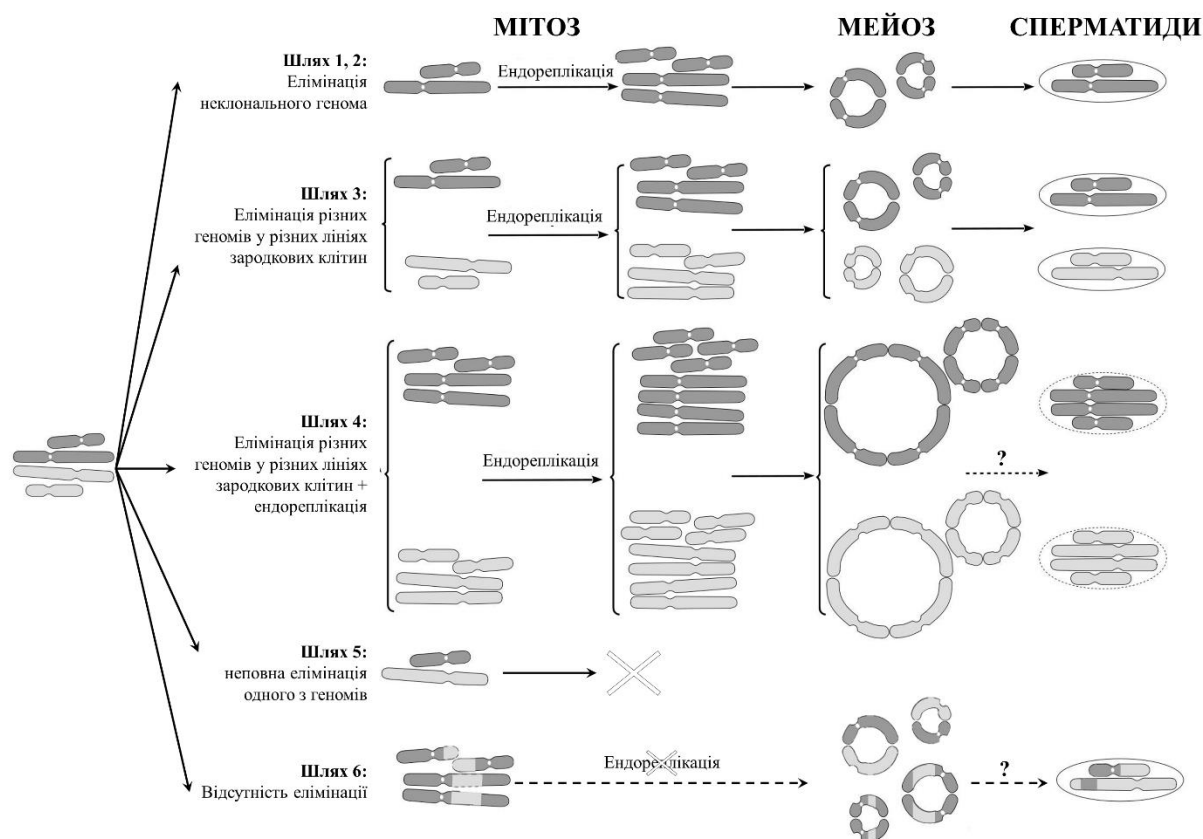


Рис. 4.1. Пропоновані шляхи гамето­ге­не­зу у гібридних самців із досліджених R-E-ГПС. Темно-сірий – геном *P. ridibundus*, світло-сірий – геном *P. lessonae*.

Шлях 1, 2: елімінація геному та ендо­ре­плі­ка­ція («класичний» гібридогенез). Під час класичної елімінації геному один із батьківських геномів елімінується перед мейозом, тоді як другий ендо­ре­плі­кується, що дозволяє відновити диплоїдний набір хромосом. Такі клітини проходять мейотичний поділ з 13 бівалентами під час мейозу I та 13 унівалентами в мейозі II. Далі сперматиди несуть геном лише одного батьківського виду (*P. ridibundus* або *P. lessonae*).

Шлях 3: Геноми різних батьківських видів елімінуються в різних популяціях зародкової лінії. Тому деякі гоноцити мають лише геном *P. ridibundus*, тоді як деякі клітини мають лише хромосоми *P. lessonae*. Статеві клітини з обома батьківськими геномами дублюються та утворюють

два типи бівалентів обох батьківських видів ($2n=26$). Після мейозу II залишаються сперматиди обох батьківських видів (*P. ridibundus* і *P. lessonae*).

Шлях 4: утворення диплоїдних сперматозоїдів. Два раунди ендореplikації генома одного батьківського виду призвели до утворення тетравалентів, що несуть чотири набори генома *P. ridibundus* або *P. lessonae* у мейозі I. Такі клітини, пройшовши мейоз II, мають подвійний набір хромосом (RR, LL, або навіть LR).

Шлях 5: аномальний мейоз. Через порушення під час елімінації генома *P. ridibundus* або *P. lessonae* відсутні життєздатні сперматиди, тому особина є стерильною.

Шлях 6: відсутність премейотичної елімінації та ендореplikації. Внаслідок відсутності елімінації та ендореplikації, гібриди продукують гамети із сумішшю двох або трьох геномів одночасно внаслідок взаємної інтрогресії геномів *P. lessonae*, *P. ridibundus* та, ймовірно, ще одного виду зелених жаб.

Нещодавні дослідження показують, що селективна елімінація геному в клітинах гібридів *P. esculentus* відбувається поступово під час ділення гоноцитів під час розвитку пуголовків і не відбувається у дорослих тварин (Ogielska, 1994; Chmielewska et al., 2018, 2022; Dedukh et al., 2019, 2020). Було припущено, що елімінація геному відбувається через хромосомне «брунькування» із інтерфазного ядра та відставання під час поділу гоноцитів, що призводить до утворення мікроядер (Ogielska, 1994; Chmielewska et al., 2018, 2022; Dedukh et al., 2017; 2019, 2020). Мікроядра та поступовий процес елімінації геному були показані для гібридів з L-E систем (Dedukh et al., 2020; Chmielewska et al., 2022) та E-систем (Chmielewska et al., 2018, 2022; Dedukh et al., 2019, 2020). Крім того, мікроядра були показані для гібридних самок (Dedukh et al., 2017) і самців (Chmielewska et al., 2018, 2022) пуголовків із R-E систем. Під час елімінації геному гоноцити залишаються

анеуплоїдними, поки один із батьківських геномів не буде повністю елімінований з ядер (Dedukh et al., 2019, 2020). Ми припускаємо, що неповна елімінація геному могла спричинити анеуплоїдні метафази під час мейозу у аналізованих самців.

На основі аналізу сперматоцитів за допомогою CGH була висунута гіпотеза про відсутність премейотичного видалення генома та ендореплікації для амфіспермічних самців з R-E-систем Центральної Європи (Doležálková et al., 2016). Сперматоцити у таких самців зазвичай демонструють кон'югацію між хромосомами *P. lessonae* та *P. ridibundus*, що дозволило припустити можливість селективної сегрегації обох батьківських геномів у сперматоцити під час мейозу (Doležálková et al., 2016). Однак, ми виявили, що елімінація геному у амфіспермічних самців із R-E-ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб відбувається премейотично.

В R-E системах Центральної Європи (Uzzell et al., 1977) спостерігалася висока смертність серед потомства. Це явище можна пояснити порушеннями у процесах видалення та подвоєння геному, які призводять до формування бівалентів між хромосомами *P. lessonae* і *P. ridibundus*. У результаті спостерігаються анеуплоїдні гамети, що в свою чергу спричиняє низьку фертильність самців. На основі результатів, отриманих під час схрещування різних диплоїдних гібридів з цих самих R-E систем, була показана відсутність рекомбінантних пуголовків для усіх, окрім одного, схрещувань (Doležálková-Kašánková, Mazera et al., 2021). Тому можна припустити, що рекомбінантні та/або анеуплоїдні особини гинуть на ранніх стадіях розвитку (Arioli et al., 2010). У даній роботі ми також показали наявність кон'югації між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae* у деяких самців із досліджуваних R-E-ГПС (Рис. 3.8, 20). Результати проведеного аналізу хромосом після CGH показують, що хромосоми цих особин демонструють декілька типів забарвлення. Ми спостерігали хромосоми, які забарвлені у колір, що відповідає геному *P. ridibundus* із ділянками, які забарвлювались у колір,

відповідний геному *P. lessonae*. Це може вказувати на рекомбінацію між хромосомами з різними геномами. При чому, окрім двох кольорів, що відповідають геномам *P. lessonae* та *P. ridibundus*, ми спостерігали ділянки, або навіть цілі хромосоми, які не фарбувалися жодним із зондів з геномами батьківських видів, забарвлюючись лише DAPI (Рис. 3.12, Г-О). Міжгеномні інтрогресії клади *P. ridibundus* спостерігаються всередині ареалу доволі часто. Найчастіше, в геномах батьківських видів, а особливо в геномі *P. ridibundus* зустрічається явище інтрогресії геномів інших видів комплексу *Pelophylax*, *P. kurtmuelleri* та *P. cf. bedriagae* (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010). Вважається, що особини *P. ridibundus* відрізняються географічно за своєю здатністю індукувати елімінацію (Hotz et al., 1985). Це явище спостерігали базуючись на результатах міжвидових схрещувань (*P. ridibundus* / *P. lessonae* + неназваний вид із Югославії / *P. perezi* + неназваний вид із південної Італії), які чітко показують здатність індукування елімінації в залежності від того, який геном в парі з геномом *P. ridibundus*. Спираючись на дані щодо філогеографічного паттерну розповсюдження геномів (Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010), ми можемо припустити, що такий паттерн зафарбування вказує на інтрогресію геному третього виду, який мав би бути сестринським до *P. ridibundus*, оскільки спостерігається часткова кон'югація хромосом у біваленти. Хоча, цей геном є генетично-відмінним за складом послідовностей, що повторюються, і які ідентифікуються за допомогою CGH від обох батьківських видів, що досліджувалися у даній роботі. Варто відмітити, що у таких особин не відбувається елімінації та ендореplікації, які є основою гібридогенетичного способу відтворення, що може бути обумовлено інтрогресією генома. Додатково у таких самців спостерігалася частина сперматоцитів із нормальною кон'югацією у бівалентах під час мейозу I та з унівалентами під час мейозу II з геномами *P. lessonae* або *P. ridibundus* (Рис. 3.8). Тим не менш, такі самці демонструють велику кількість сперматоцитів та сперматид,

більша частина з яких є анеуплоїдними. Крім того, у самців №833 і 867 ми зареєстрували відсутність сперматид і знижену фертильність. Таким чином, елімінація та ендореplikація геномів необхідні для відтворення міжвидових гібридів.

Цікаво, що анеуплоїдні сперматоцити можуть вступати в мейоз і виходити за межі стадії пахітен (поточні дані, Arioli et al., 2010). Крім того, анеуплоїдні сперматоцити здатні долати мейотичні поділи, які призводять до анеуплоїдних сперматид. Подібним чином, велика кількість анеуплоїдних мейоцитів була виявлена під час сперматогенезу диплоїдних і триплоїдних гібридів з E-систем (Chmielewska et al., 2022). Частка анеуплоїдних клітин зменшувалася в процесі розвитку від стадії пуголовка до метаморфозу (Chmielewska et al., 2022). Цікаво, що у самок навіть із досліджених місцевостей не виявлено анеуплоїдних ооцитів (Giorgi, Galleni, 1972; Bucci et al., 1990; Dedukh et al., 2015; 2017). Ми можемо припустити, що гаметогенез самиць є більш вибіркоvim щодо усунення анеуплоїдних клітин. Це може бути пов'язано з великою кількістю апоптичних клітин на ранніх стадіях розвитку (Szydłowski et al., 2017).

Молекулярна основа селективної елімінації геному у гібридів зелених жаб недостатньо вивчена. Одне з можливих пояснень полягає в ролі центромерних ділянок, які у хромосом батьківських видів мають різну здатність прикріплення до кінетохора і таким чином, подальшу селективну елімінацію хромосом одного з батьківських видів (Sanei et al., 2011; Marimuthu et al., 2021). Переважне завантаження центромерних гістонів викликає селективну елімінацію геному в гібридів рослин (Sanei et al., 2011). Крім того, диморфізм розміру центромери, ймовірно, спричинив селективну елімінацію геному у міжвидових гібридів різних видів рослин (Fukagawa, Earnshaw, 2014; Musacchio, Desai, 2017; Bloom, Costanzo, 2017; Ishii et al., 2016). Ми виявили, що гібриди в R-E-ГПС видаляють геном *P. lessonae* зі своїх клітин частіше, ніж геном *P. ridibundus*. Раніше було показано, що

перичентромерний повтор RrS1 відрізняється в хромосомах *P. ridibundus* і *P. lessonae* (повтор RrS1 представляє 12,5% геному *P. ridibundus* і лише 0,2% геному *P. lessonae*) (Ragghianti et al., 1995). Такі відмінності в кількості копій цього повтору в геномах різних батьківських видів можуть спричинити неправильне розташування та відставання хромосом *P. lessonae* під час розмноження гоноцитів. Це може бути пов'язано з підвищеною здатністю мікротрубочок приєднуватися до хромосом *P. ridibundus* у гібридів із L-E та E систем (Dedukh et al., 2020). Цікаво, що міжвидові схрещування між видами зі збагаченим RrS1 (*P. bedriagae*, *P. epeiroticus*, *P. kurtmuelleri*, *P. ridibundus*) не демонструють схожого паттерну елімінації геному, бо мають незначні відмінності у геномі, і через це жоден із схожих геномів не індукує елімінацію іншого (Guerrini et al., 1997; Maracci et al., 2011). Ми можемо припустити, що центромери *P. lessonae* із більшою кількістю повтору RrS1 (або іншим (пери)центромерним тандемним повтором) можуть бути стійкими до елімінації, що призводить до мейоцитів із 26 бівалентами або унівалентами, які спостерігаються у гібридів із різних локалітетів (Uzzell et al., 1980; Hotz, Uzzell, 1983; Hotz et al., 1985; Pustovalova et al., 2022; 2023). Крім того, ми припускаємо, що у гібридів із R-E-ГПС хромосоми *P. lessonae* є більш конкурентоздатними, ніж хромосоми *P. ridibundus* у своїй здатності прикріплюватися до кінетохорів. Це призводить до їх більш переважної передачі в деяких популяціях гоноцитів, що може спричинити гібридну амфіспермію.

4.3. Амфіспермічні самці та різноманіття продукованих гамет забезпечують відтворення гібридів у різних популяційних системах Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб

Ми дослідили сперматогенез гібридів із чотирьох різних R-E-Ep-ГПС та оцінили роль змін у гаметогенезі за допомогою аналізу геному, який міститься у сперматоцитах та сперматидах.

Ми знайшли принаймні шість шляхів гаметогенезу як у диплоїдних, так і у триплоїдних гібридів з усіх досліджених ГПС (Рис. 4.1). Ці шляхи включають утворення гаплоїдних гамет з геномом *P. ridibundus* або *P. lessonae*, одночасне продукування гамет з геномом *P. ridibundus* і *P. lessonae* (амфіспермія) та утворення анеуплоїдних гамет. Крім цього, ми та деякі інші автори виявили ще один тип сперматогенезу, що призводить до утворення диплоїдних гамет (Mikulíček, Kotlík, 2001; Mikulíček et al., 2014; Pruvost et al., 2013, 2015; Biriuk et al., 2016; Pustovalova et al., 2022; Chmielewska et al., 2022). Таким чином, ми припускаємо високу різноманітність шляхів сперматогенезу, які притаманні гібридним самцям з різних R-E-ГПС, розташованих у Східній Україні. Для самок із R-E-ГПС раніше було показано одночасне продукування гамет з геномом *P. ridibundus*, а також диплоїдних LR гамет (Dedukh et al., 2015, 2017). Цікаво, що диплоїдні гібридні самки на відміну від самців надзвичайно рідко продукували гамети з геномами *P. lessonae* (Dedukh et al., 2015, 2017; Biriuk et al., 2016). На відміну від R-E-ГПС, шляхи сперматогенезу у гібридних самців з L-E-ГПС більш консервативні (Uzzell et al., 1980; Graf, Polls-Pelaz, 1989; Plötner, 2005; Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022). Виходячи з результатів схрещування, як самці, так і самки з L-E-ГПС зазвичай видаляють геном *P. lessonae* і передають у гаметах геном *P. ridibundus* (Heppich, 1978; Uzzell et al., 1980; Vucci et al., 1990; Tunner, Heppich-Tunner, 1991; Pruvost et al., 2013; Dubey et al., 2019; Dedukh et al., 2019; Svinin et al., 2021; Chmielewska et al., 2022). Крім того, за допомогою проточної цитометрії Vinogradov et al. (1988, 1990) показали, що гібридні самці в L-E-ГПС продукують низьку кількість анеуплоїдних сперматозоїдів. Однак детального аналізу сперматогенезу дорослих самців із L-E систем досі не проводили. Цікаво, що різноманітність шляхів сперматогенезу у гібридів із R-E-ГПС також притаманна гібридам із чистих гібридних систем (E-ГПС), які продукують гамети із різними геномами, що було показано на основі

результатів схрещування (Christiansen et al., 2005; Christiansen, Reyer, 2009; Christiansen, 2009; Dedukh et al., 2020; Chmielewska et al., 2022). Амфіспермічні самці поодинокі зустрічаються в Е-ГПС (Christiansen, 2009; Chmielewska et al., 2022). Проте, у всіх чотирьох проаналізованих R-Е-ГПС ми виявили домінування (43-100%) таких гібридів (Рис. 4.2; Додатковий рис. 2). Такі самці, імовірно, відіграють вирішальну роль у підтримці популяційних систем, забезпечуючи різноманітність гамет і формування гамет із геномом *P. lessonae* зокрема.

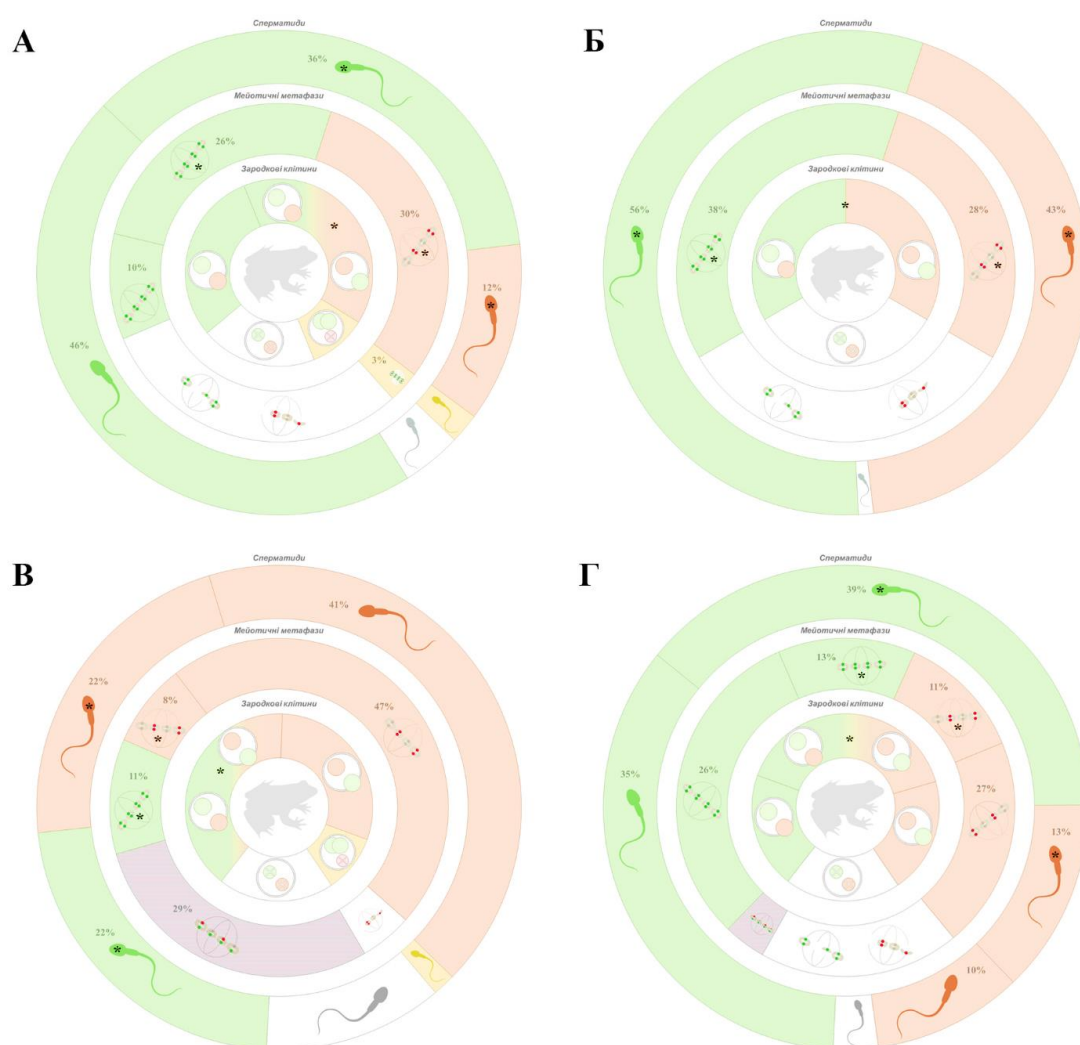


Рис. 4.2. Пропоновані шляхи гаметогенезу та внесок гібридних самців у підтримку різних R-Е-ГПС. А – Нижній Добрицький став, Б – Ісків став, В – заплава річки Мож, Г – Коряків став. Рожевий - зародкові клітини, метафази,

сперматиди з геномом *P. lessonae*, зелений - зародкові клітини, метафази, сперматиди геном *P. ridibundus*, білий - зародкові клітини, анеуплоїдні метафази з *P. lessonae* та/або *P. ridibundus* геномом, сперматиди з геномом *P. lessonae*, жовтий - тетраплоїдні зародкові клітини, метафази, диплоїдні сперматиди, сірий - метафази з кон'югованими хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*; зірочки (*) позначають зародкові клітини, метафази, сперматиди, які продукують амфіспермічні самці. Внутрішнє коло вказує на ймовірні шляхи гаметогенеза, пов'язані з премейотичною елімінацією на ендореплікацією геному *P. lessonae* та/або *P. ridibundus* у зародкових клітинах гібридів на стадії пуголовка; середнє коло вказує на частку мейотичних метафаз (з геномом *P. lessonae* та/або *P. ridibundus*) у сім'яниках гібридів, яку ми зареєстрували в результаті аналізу; зовнішнє коло вказує на частку утворених гібридами сперматид (з геномом *P. lessonae* та/або *P. ridibundus*), яку ми зареєстрували в результаті аналізу.

Незважаючи на масово зареєстрованих амфіспермічних самців у всіх досліджених локалітетах, ми виявили, що шляхи гаметогенезу відрізняються у гібридних самців у кожній досліджуваній R-E-ГПС. Цікаво, що диплоїдні гібридні самці продукували переважно гамети з геномом *P. ridibundus*, тоді як частка гамет із геномом *P. lessonae* була загалом низькою (Biriuk et al., 2016, Dedukh et al., 2017). В одному з локалітетів (Іськів став) ми виявили лише амфіспермічних самців (Рис. 4.2Б), тоді як попередні дослідження показали, що невелика кількість самців продукувала гамети виключно з геномом *P. ridibundus* (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017). В інших локалітетах, окрім амфіспермічних самців, ми виявили гібридів, що продукували гаплоїдні гамети виключно з геномом *P. lessonae* (Коряків став) (Рис. 4.2А) та гібридів, що продукують гамети виключно з геномом *P. ridibundus* (р. Мож) (Рис. 4.2В). Лише в одному локалітеті (Нижній Добрицький став) ми виявили амфіспермічних самців, а також гібридних

самців, що продукують гаплоїдні гамети з геномом *P. lessonae*, і гібридних самців, які продукують гаплоїдні гамети виключно з геномом *P. ridibundus* (Рис. 4.2Г). На відміну від R-E-систем, відтворення гібридних самців у системах L-E також відрізняється (Pruvost et al., 2013; Dedukh et al., 2019; Svinin et al., 2021; Chmielewska et al., 2022). У системах L-E Центральної Європи самці та самки переважно фертильні та виробляють життєздатні гамети (Pruvost et al., 2013; Chmielewska et al., 2022). Тоді як у північно-східних популяційних системах самки виробляють велику кількість ооцитів з унівалентами, які утворюють анеуплоїдні гамети (Dedukh et al., 2019; Svinin et al., 2021). Оскільки ми спостерігали мінливість гаметогенетичних змін у гібридних самців, ми припускаємо, що різні R-E-ГПС мають різні механізми підтримки.

У всіх досліджених R-E-ГПС ми виявили самців, які продукували анеуплоїдні метафази та сперматиди, що вказує на порушення елімінації та/або ендореплікації. Незважаючи на наявність анеуплоїдних гамет у гібридних самців з усіх локалітетів, в одному з них (Коряків став) ми виявили надзвичайно велику кількість порушень у гібридних самців (Рис. 3.8, 20, 22В). Гібридні самці з цього локалітету продукували численні метафази з аберантною кон'югацією хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae* під час мейозу I (Рис. 3.8). Подібний феномен такої кон'югації між хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae* також був показаний для систем R-E з басейну річки Одер (Doležálková et al., 2016). У разі успішного поділу такі мейотичні хромосоми здатні утворювати гамети з рекомбінантними геномами, які були виявлені раніше (Uzzell et al., 1977; Arioli et al., 2010; Biriuk et al., 2016; Doležálková-Kašánková, Mazera et al., 2021). Однак, не дивлячись на можливість формування поодиноких рекомбінантних гамет, такі аберації, ймовірно, можуть призвести до виявлення анеуплоїдних сперматозоїдів у цих самців, що різко знижує їх фертильність (Рис. 4.1). Утворення анеуплоїдних сперматозоїдів викликає високу смертність потомства, що було показано за

результатами схрещування (Uzzell et al., 1977; Doležálková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Такі клітини під час мейозу самців зареєстровані у великій кількості, і це призводить до зниження фертильності таких самців (Doležálková et al., 2016) Крім того, в одного самця ми не знайшли сперматид, що вказує на його повну стерильність. Таким чином, наші результати підтверджуються попередніми твердженнями про те, що гібридні самці в R-E-ГПС демонструють велику кількість відхилень, які призводять до утворення анеуплоїдних гамет.

Один гібридний самець продукував сперматоцити з 13 тетравалентами *P. ridibundus* і 13 тетравалентами *P. lessonae*, що вказує на те, що частина його клітин пройшла додатковий раунд ендореплікації геному (Рис. 4.1). Щоб утворити сперматоцити з 13 тетравалентами *P. ridibundus*, клітини повинні спочатку елімінувати хромосоми *P. lessonae*, після чого має відбутися два раунди дуплікації хромосом *P. ridibundus*, і навпаки для тетравалентів *P. lessonae*.

Сперматоцити з 13 тетравалентами під час мейозу I з обома геномами батьківського виду свідчать про відсутність елімінації геному та двох раундів ендореплікації геному. Наявність інтерфазних клітин з 26 хромосомами *P. ridibundus* узгоджується з раніше отриманими результатами для диплоїдних гібридних самців за допомогою аналізу метафазних пластинок та виявлених таким чином тетравалентів (Ragghianti et al., 2007). Подібні результати отримали також Dedukh et al. (2015) під час аналізу хромосом типу лампових щіток, де автори знайшли одну диплоїдну гібридну самку з 26 бівалентами з геномом *P. ridibundus*. Крім того, такий паттерн підтверджує наявність двох раундів ендореплікації геному, що передує мейозу після елімінації одного з батьківських геномів. Хромосомні пластинки з тетравалентами зазвичай утворюються в автополіплоїдних жаб роду *Pleuroderma* (Salas et al., 2014). Тим не менш, у цих видів бі-, тетра- та октаваленти також були виявлені серед метафазних пластинок, що свідчить

про деякі неточності в процесі кон'югації (Salas et al., 2014). Бі та Богарт (2010) показали наявність квадривалентів (те ж саме, що і тетраваленти) у гібридних самок *Ambystoma*, досліджуючи хромосоми типу лампових щіток, припускаючи випадкові синапси між гомологічними хромосомними ділянками. Тим не менш, такі ооцити є рідкісним явищем для амбістоми (Бі, Bogart, 2010), тоді як у досліджуваного самця зеленої жаби ми спостерігали велику кількість сперматоцитів із тетравалентами. Ми припустили, що ці клітини можуть проходити через мейоз і утворювати диплоїдні сперматозоїди з геномами LL, RL і RR (Рис. 4.1). Такі гамети можуть призвести до появи триплоїдних жаб (приблизно 5%), яких ми також зареєстрували в басейні р. Мож (Drohvalenko et al., 2022). Однак успіх запліднення диплоїдних сперматозоїдів, щоб конкурувати з гаплоїдними сперматозоїдами, потребує подальшого дослідження.

Триплоїдні гібриди зазвичай видаляють геном, представлений в одній копії (*P. ridibundus* для LLR і *P. lessonae* для LRR) і продукують переважно гаплоїдні гамети з геномами *P. ridibundus* і *P. lessonae* відповідно (Günther, Uzzell, Berger, 1979; Berger, 1988; Tunner, 1991; Tunner, Heppich-Tunner, 1992; Graf, Polls-Pelaz, 1989; Ogielska, 1994; Mikulíček, Kotlík, 2001; Plötner, 2005; Christiansen, Reyer, 2009; Reyer et al., 2015; Dufresnes, Mazepa, 2020; Dedukh et al., 2015, 2017, 2020; Chmielewska et al., 2022). Це підтверджує результати, отримані раніше для триплоїдних гібридних самців із досліджуваних R-E-ГПС (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017), а також L-E систем (Mikulíček, Kotlík, 2001; Pruvost et al., 2013, 2015) та E систем (Pruvost et al., 2013; Christiansen, 2009; Christiansen, Reyer, 2009; Chmielewska et al., 2022). Однак, ми знайшли триплоїдного гібридного самця з геномом LRR, який також продукував анеуплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*. Подібні результати для самців LRR були показані раніше (Christiansen, 2009; Biriuk et al., 2016). А нещодавні дослідження Chmielewska et al. (2022) виявили продукування гамет *P. ridibundus* здебільшого разом із незначною кількістю

анеуплоїдних і навіть диплоїдних сперматозоїдів. Використовуючи аналіз хромосом типу лампових щіток, Dedukh et al. (2015, 2017) показали для R-E-ГПС зі Східної України, що триплоїдні гібридні самки з геномом LLR продукували гамети з геномом *P. ridibundus*, а також триплоїдні гамети з двома геномами *P. ridibundus* та одним геномом *P. lessonae*. У нашому дослідженні обидва триплоїдні самці LLR продукували гаплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae* та потенційно диплоїдні сперматиди з двома геномами *P. lessonae* (рис. 1, F). Ми також виявили утворення метафаз LR, LL та RR у мейозі I та диплоїдних сперматозоїдів зі складом геному RR або LR для диплоїдних гібридних самців із досліджуваних R-E-ГПС (Pustovalova et al., 2022). Триплоїдні самки LLR з досліджуваних локалітетів продукували гамети з *P. lessonae*, *P. ridibundus*, а також диплоїдні гамети з геномами LR (Dedukh et al., 2015). Утворення диплоїдних гамет було показано для триплоїдних самців з L-E систем за допомогою білкового електрофорезу та проточної цитометрії (Mikulíček, Kotlík, 2001; Pruvost et al., 2013, 2015), а також, для триплоїдних і диплоїдних самців і самок у E системах (Christiansen, 2009; Reyer et al., 2015) шляхом аналізу потомства. Злиття двох диплоїдних гамет, утворених гібридами, може пояснити появу рідкісних тетраплоїдних особин (Borkin et al., 2004; Christiansen et al., 2010; Reyer et al., 2015). Таким чином, ми припускаємо, що триплоїдні гібриди в досліджуваних системах мають порушення в гаметогенезі, які призводять до зменшення життєздатних гамет.

Спостережувані відмінності у сперматогенезі диплоїдних гібридних самців із R-E-ГПС можуть бути спричинені незалежним походженням гібридів у досліджуваних системах. Згідно з мікросателітним аналізом клонально передаваних геномів, було зроблено припущення, що гібриди в різних системах R-E у Східній Україні мають множинне походження (Fedorova et al., готується до публікації). Крім того, кожна ГПС, ймовірно, має свій власний шлях еволюції через різноманітність гамет, вироблених

різними гібридами. Навпаки, R-E системи в річці Одер походять від однієї лінії клонального генома *lessonae* і поширюються вздовж річки Одер (Doležálková-Kaštánková et al., 2018; Doležálková-Kaštánková, Mazera et al., 2021). Диплоїдні гібриди в річці Одер продукують гамети лише з геномом *P. lessonae* або з обома батьківськими геномами (амфіспермічні). На додаток, вони мають знижену фертильність, спричинену великою кількістю метафаз із кон'югацією між хромосомами *P. lessonae* та *P. ridibundus* (Doležálková et al., 2016). Оскільки через порушену елімінацію одного з геномів виникають анеуплоїдні гамети, які не утворюють життєздатного потомства.

Таким чином, ми бачимо, що підтримка стійкості ГПС відбувається за рахунок великої кількості гібридів, які можуть продукувати одночасно декілька типів життєздатних гамет (амфіспермічні), як гаплоїдних, які необхідні для утворення гібридів, так і диплоїдних, які забезпечують утворення триплоїдних гібридів. В свою чергу, триплоїди забезпечують рекомбінантні гамети, які збагачують генетичне різноманіття гібридів і їх виживання на стабільному рівні.

4.4. Різноманіття шляхів гаметогенезу – переваги та недоліки утворення гамет різного типу

Щоб забезпечити успішну передачу геміклонального геному, гібридні організми повинні відповідним чином модифікувати свій гаметогенез. Гібриди F1 між *P. ridibundus* і *P. lessonae* демонструють премейотичну елімінацію генома та ендореplikацію, що допомагає їм бути фертильними (Tunner, Herrich-Tunner, 1991; Dedukh et al., 2019). Однак премейотична елімінація генома та ендореplikація відбуваються не у всіх популяціях статевих клітин, що спричиняє незвичайну кон'югацію хромосом в мейозі та порушення процесу утворення гамет, що знижує фертильність у життєздатних особин (Vorburger, 2001; Dedukh et al., 2015, 2019, 2020; Doležálková та ін., 2016). Повідомлені випадки порушень процесу елімінації

та/або ендореplikації геному викликають утворення анеуплоїдних клітин як у мітозі, так і в мейозі (Рис. 4.1). На відміну від R-E систем, гібриди зелених жаб з популяційних систем L-E типу є фертильними і зазвичай демонструють низьку кількість анеуплоїдних сперматозоїдів (Vinogradov et al., 1988, 1990). Це можливо завдяки стабільній елімінації генома *P. lessonae* під час гаметогенезу та передачі геному *P. ridibundus* у гаметах. Однак не всі зміни в процесах елімінації чи / та ендореplikації геному негативно впливають на розмноження гібридних жаб. Принаймні один гібридний самець зі Східної України потенційно продукував диплоїдні сперматозоїди з геномами LL, RL та RR. Утворення диплоїдних гамет має вирішальне значення для появи триплоїдних гібридів у деяких популяційних системах (Tunner, Neppich-Tunner, 1992; Brychta, Tunner, 1994; Rybacki, 1994; Mikulíček, Kotlík, 2001; Pruvost et al., 2015).

Наші результати підкреслюють, що гібриди мають додаткову проблему щодо вибіркової елімінації геному *P. ridibundus*. Під час первинного схрещування *P. ridibundus* і *P. lessonae* гібриди зазвичай передають геном *P. ridibundus* і видаляють геном *P. lessonae* (Berger et al., 1971; Dedukh et al., 2019). Подальші зворотні схрещування диплоїдних гібридів з особинами *P. lessonae* забезпечують збереження гібридів і призводять до формування змішаної популяції між гібридами та *P. lessonae* (Berger, 1971; Günther, 1883; Christiansen, Reyer, 2009). Гібридогенетичне розмноження гібридних жаб у цьому типі популяційних систем характеризується стабільним розмноженням геному *P. ridibundus* з відносно рідкісними абераціями в елімінації та ендореplikації геному (Berger, 1971; Graf, Müller, 1979; Pruvost et al., 2013; Dedukh et al., 2019). З іншого боку, ми та інші (це дослідження; Uzzell et al., 1976; Graf, Polls-Pelaz, 1989; Vinogradov, 1991; Plötner, 2005; Dedukh et al., 2015, 2017; Biriuk et al., 2016) показали, що гібридні жаби в змішаній популяції з *P. ridibundus* здебільшого виробляли R-гамети, незважаючи на те, що L-гамети є «вирішальними клітинами» для збереження гібридів (Рис. 4.2).

Оскільки гаплоїдні гамети з геномом *P. ridibundus* не призведуть до гібридного потомства, якщо гібриди живуть разом з *P. ridibundus*, ці гібриди повинні виробляти не просто фертильні гамети, але ці гамети мають бути із «правильним» складом геному (= *lessonae*), для підтримки гібридного відтворення. Такі труднощі у формуванні гамет з геномом *P. lessonae* можуть пояснити ситуацію, чому змішані популяції гібридів і *P. ridibundus* настільки рідкісні в континентальній Європі порівняно з популяціями, де гібриди співіснують з *P. lessonae* (Uzzell et al., 1976; Graf and Polls-Pelaz, 1989; Plötner, 2005). Крім того, еволюційне утворення центральноєвропейських популяцій *P. ridibundus* – *P. esculentus* (де були знайдені тільки гібридні самці, а самки були відсутні), здається, є рідкісною подією, оскільки клонально успадковані геноми *Lessonae* є абсолютно ідентичні, тобто мають одного спільного предка (Doležálková et al., 2016; Doležálková-Kaštánková et al., 2018, 2021).

Тим не менш, добре задокументована стійкість диплоїдних гібридних самців у великій чисельності протягом десятиліть спостережень у змішаних популяціях з *P. ridibundus* (Borkin et al., 2004; Shabanov et al., 2020) залишається загадкою. 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. Крім того, тривале клональне розмноження геному теоретично може призводити до накопичення шкідливих мутацій і таким чином зменшувати виживання гібридів (Tunner, Heppich-Tunner, 1991; Christiansen et al., 2005; Christiansen, 2009; Dubey et al., 2019). Ми припускаємо, що фактичне процвітання гібридів можна пояснити загалом ефектом гібридного гетерозису над *P. ridibundus* (Berger, 1977; Hotz et al., 1999). Однак, враховуючи високу варіабельність R-геномів у гібридних

пуголовків і високе алельне різноманіття R-геномів у проаналізованих пуголовків, деякі інші причини також можуть призвести до смерті більшості пуголовків *P. ridibundus* (Fedorova et al., готується до публікації).

ВИСНОВКИ

1. З використанням FISH із видоспецифічними до перицентромерних ділянок хромосом зондами показано, що з 52 досліджених диплоїдних гібридних самців 5 особин мали у сім'яниках сперматоцити та сперматида виключно із геномом *Pelophylax lessonae*, а 13 особин — виключно з геномом *Pelophylax ridibundus*. 29 особин в одних сперматоцитах та сперматиди мали геном *P. lessonae*, а в інших — геном *P. ridibundus*; за запропонованою нами термінологією, ці особини є амфігаметними. Ще у 8 самців з 52, що були досліджені, у сім'яниках зареєстровано диплоїдні сперматоцити та поодинокі диплоїдні сперматида.

2. У 5 самців з 52, що були досліджені, в мейотичних хромосомних пластинках зареєстровано кон'югацію між хромосомами різних видів (*P. lessonae* та *P. ridibundus*) у біваленти. Деякі хромосоми цих особин після проведеного CGH із геномами обох батьківських видів демонстрували зафарбовування різних ділянок у кольори, що є характерними для обох батьківських видів. Це може бути свідченням рекомбінації між хромосомами різних видів. Крім того, у 2 самців на препаратах можна спостерігати наявність хромосом, що не належать ані *P. lessonae*, ані *P. ridibundus*. Ми висуваємо припущення, що ці хромосоми належать якомусь іншому виду зелених жаб, генетичний матеріал якого бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*.

3. Зареєстровано шість шляхів гаметогенезу у гібридних самців:

- продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. lessonae* (L);
- продукування гаплоїдних гамет із геномом *P. ridibundus* (R);
- продукування суміші гаплоїдних гамет, деякі з яких несуть геном L, а інші несуть геном R (феномен гібридної амфігаметності);
- продукування диплоїдних гамет зі складом геномів RR, LL, LR;
- продукування анеуплоїдних гамет із різним складом геному;

— продукування гамет із сумішшю двох або трьох геномів одночасно внаслідок взаємної інтрогресії геномів *P. lessonae*, *P. ridibundus* та, ймовірно, ще одного виду зелених жаб.

4. Усі досліджені оселища Сіверсько–Донецького центру різноманіття зелених жаб, а саме: Нижній Добрицький став, Коряків яр, Іськів став та заплава річки Мож в с. Тимченки, населені R–E–Er–ГПС *Pelophylax esculentus* complex. Попри переважну передачу гібридами в досліджуваних ГПС геномів R, в цих ГПС щороку спостерігається велика частка гібридів і наявність лише одиничних дорослих особин *P. ridibundus*. Більшість проаналізованих сперматоцитів та сперматид (60%) мали геном R, та лише 33% сперматоцитів та сперматид мали геном L. Це не відповідає наявним науковим уявленням, згідно з якими гібриди продукують переважно гамети із геномом виду, який відсутній в ГПС, де вони відтворюються (як це відбувається в L–E–ГПС, де гібриди передають геном R) і свідчить про своєрідність механізмів підтримання стійкості в R–E–Er–ГПС.

5. Наявність 14% анеуплоїдних клітин серед проаналізованих сперматоцитів та сперматид свідчить про недосконалість регуляції елімінації та ендореplikації у клітинах зародкової лінії міжвидових гібридів. Базуючись на даних, які були отримані в ході досліджень елімінації геному у гібридних рослин, ми робимо припущення, що причина цього феномену полягає у відмінностях в кількості копій центромерного повтору в геномах різних батьківських видів, які можуть спричинити неправильне розташування та відставання хромосом *P. lessonae* під час розмноження гоноцитів. Оскільки дані, які показували б наслідки цього процесу у зелених жаб відсутні, ми припускаємо, що у гібридних особин хромосоми *P. ridibundus* є більш здатними прикріплюватися до кінетохорів під час поділу гоноцитів, і це є причиною їх більш успішної клональної передачі у гамети.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abbott, R. J., Hegarty, M. J., Hiscock, S. J., & Brennan, A. C. (2010). Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon*, 59(5), 1375-1386.
2. Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J., Bierne, N., ... & Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of evolutionary biology*, 26(2), 229-246.
3. Ahmadli, U., Kalidass, M., Khaitova, L. C., Fuchs, J., Cuacos, M., Demidov, D., ... & Lermontova, I. (2023). High temperature increases centromere-mediated genome elimination frequency and enhances haploid induction in *Arabidopsis*. *Plant Communications*, 4(3).
4. Akın, Ç., Can Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., ... & Plötner, J. (2010). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 37(11), 2111-2124.
5. Alpagut, N., & Falakali, B. (1995). Karyotype analysis of two *Rana ridibunda* (Ranidae; Anura) populations in Turkey. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 41(4), 523-531.
6. Al-Shehri, A. H., & Al-Saleh, A. A. (2005). Karyotype of amphibian in Saudi Arabia. 1. The karyotype of *Rana ridibunda*. *J. Biol. Sci*, 5(3), 335-338.
7. Alves, M. J., Coelho, M. M., & Collares-Pereira, M. J. (1998). Diversity in the reproductive modes of females of the *Rutilus alburnoides* complex (Teleostei, Cyprinidae): a way to avoid the genetic constraints of uniparentalism. *Mol. Biol. Evol*, 15(10), 1233-1242.
8. Alves, M. J., Coelho, M. M., & Collares-Pereira, M. J. (2001). Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica*, 111, 375-385.
9. 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.

10. Arnold, M. L., & Hodges, S. A. (1995). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents?. *Trends in ecology & evolution*, 10(2), 67-71.
11. Avise, J. (2008). Clonality: the genetics, ecology, and evolution of sexual abstinence in vertebrate animals. *Oxford University Press*.
12. Bell, G. (1982). The masterpiece of nature: the genetics and evolution of sexuality. *Berkeley: University of California Press*.
13. Berger, L. (1964). Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species? *Annales Zoologici*, 22 (13), 245–261.
14. Berger, L. (1968). Morphology of the F1 Generation of various crosses within *Rana esculenta*-complex. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 13, 301–324.
15. Berger, L. (1969). Systematyka i systemy genetyczne zab zielonych Europy. *Przegrad Zoologiczny*, 8(3), 219-238. [Польською].
16. Berger, L. (1970). Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development. *Annales zoologici*, 27, 374–410.
17. Berger, L. (1971). Sex ratio in the F1 progeny within forms of *Rana esculenta* complex. *Genetica polonica*, 12(1-2).
18. Berger, L. (1971). Viability, sex and morphology of F2 generation within forms of *Rana esculenta* complex. *Zoologica Poloniae*, 21(4), 345–393.
19. Berger, L. (1973). Systematics and hybridization in European green frogs of *Rana esculenta* complex. *Journal of Herpetology*, 1-10.
20. Berger, L. (1977). Systematics and hybridization in the *Rana esculenta* complex. In *The reproductive biology of amphibians* (pp. 367-388). Boston, MA: Springer US.
21. Berger, L. (1983). Systematyka i systemy genetyczne zab zielonych Europy. *Przegrad Zoologiczny*, 28, 47-61 [Польською].
22. Berger, L. (1988). An all-hybrid water frog population persisting in agrocenoses of central Poland (Amphibia, Salientia, Ranidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 202-219.

23. Berger, L., & Berger, W. A. (1994). Persistence of all-hybrid water frog populations [*Rana kl. esculenta*] in northern Germany. *Genetica polonica*, 35(1-2), 73-80.

24. Berger, L., & Günther, R. (1988). Genomic composition and reproduction of water frog populations (*Rana esculenta* Synklepton) near nature reserve Serrahn, GDR. *Berlin, Archiv für Naturschutz und Landschaftsforschung*, 28(4), 265–280.

25. Berger, L., & Roguski, H. (1978). Ploidy of progeny from different egg size classes of *Rana esculenta* L. *Folia biologica*, 26(4), 231-248.

26. Berger, L., & Rybacki, M. (1992). Sperm competition in European water frogs. *Alytes*, 10(4), 113-116.

27. Berger, L., & Rybacki, M. (1994). Sperm competition between two species of European water frogs [*Rana ridibunda* and *Rana lessonae*]. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).

28. Berger, L., Roguski, H., & Uzzell, T. (1978). Triploid F2 progeny of water frogs (*Rana esculenta* complex). *Folia Biologica*, 26(3), 135-152.

29. Berger, L., Uzzell, T., & Hotz, H. (1988). Sex determination and sex ratios in western Palearctic water frogs: XX and XY female hybrids in the Pannonian Basin?. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 220-239.

30. Bi, K., & Bogart, J. P. (2010). Probing the meiotic mechanism of intergenomic exchanges by genomic in situ hybridization on lampbrush chromosomes of unisexual *Ambystoma* (Amphibia: Caudata). *Chromosome Research*, 18, 371-382.

31. Binkert, J., Borner, P., & Chen, P. S. (1982). *Rana esculenta* complex: an experimental analysis of lethality and hybridogenesis. *Experientia*, 38, 1283-1292.

32. Biriuk, O. V., Shabanov, D. A., Korshunov, A. V., Borkin, L. J., Lada, G. A., Pasyukova, R. A., ... & 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.

33. Birstein, V. J. (1984). Localization of NORs in karyotypes of four *Rana* species. *Genetica*, 64(3), 149-154.

34. Blankenhorn, H. J. (1977). Reproduction and mating behavior in *Rana lessonae*—*Rana esculenta* mixed populations. In *The reproductive biology of amphibians* (pp. 389-410). Boston, MA: Springer US.

35. Bloom, K., & Costanzo, V. (2017). Centromere structure and function. Centromeres and Kinetochores: Discovering the Molecular Mechanisms Underlying *Chromosome Inheritance*, 515-539.

36. Bogart, J. P., Bi, K., Fu, J., Noble, D. W., & Niedzwiecki, J. (2007). Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome*, 50(2), 119-136.

37. Bogart, P., & Dawley, R. M. (1989). Evolution and ecology of unisexual vertebrates. *New York State*.

38. Bohlen, J., & Ráb, P. (2001). Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for conservation. *Journal of Fish Biology*, 59, 75-89.

39. Borkin, L. J., Korshunov, A. V., Lada, G. A., Litvinchuk, S. N., Rosanov, J. M., Shabanov, D. A., & Zinenko, A. I. (2004). Mass Occurrence of Polyploid Green Frogs (*Rana esculenta* Complex) in Eastern Ukraine. *Russian Journal of Herpetology*, 11(3), 203-222.

40. Bove, P., Milazzo, P., & Barbuti, R. (2014). The role of deleterious mutations in the stability of hybridogenetic water frog complexes. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 1-13.

41. Brychta, B. H., & Tunner, H. G. (1994). Flow cytometric analysis of spermatogenesis in triploid *Rana esculenta*. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).

42. Bucci, S., Ragghianti, 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. *Journal of Experimental Zoology*, 255(1), 37-56.
43. Bullini, L. (1994). Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends in ecology & evolution*, 9(11), 422-426.
44. Čavlović, K., Buj, I., Karaica, D., Jelić, D., & Choleva, L. (2018). Composition and age structure of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura; Ranidae) population in inland Croatia. *Salamandra*, 54(1).
45. Chan, W. Y., Hoffmann, A. A., & van Oppen, M. J. (2019). Hybridization as a conservation management tool. *Conservation Letters*, 12(5), e12652.
46. Chmielewska, M., Dedukh, D., Haczkiwicz, K., Rozenblut-Kościsty, B., Kaźmierczak, M., Kolenda, K., ... & 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), 7870.
47. 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, 1008506.
48. Choleva, L., & Janko, K. (2013). Rise and persistence of animal polyploidy: evolutionary constraints and potential. *Cytogenetic and genome research*, 140(2-4), 151-170.
49. Choleva, L., Doležálková-Kaštánková, M., Labajova, V., Sember, A., Altmanova, M., Luksikova, K., ... & Dedukh, D. (2023). Formation of hemiclinal reproduction and hybridogenesis in *Pelophylax* water frogs studied with species-specific cytogenomic probes. *bioRxiv*, 2023-11. doi:10.1101/2023.10.29.564577

50. 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, 1-16.

51. Christiansen, D. G., & Reyer, H. U. (2009). From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs. *Evolution*, 63(7), 1754-1768.

52. 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*, 59(6), 1348-1361.

53. 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), 1-14.

54. Cimino, M. C. (1972). Egg-production, polyploidization and evolution in a diploid all-female fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution*, 294-306.

55. Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation* Sinauer Associates. Sunderland, MA, 276, 281.

56. Craig, J. M., & Choo, K. A. (2005). Kiss and break up—a safe passage to anaphase in mitosis and meiosis. *Chromosoma*, 114, 252-262.

57. Cuellar, O. (1971). Reproduction and the mechanism of meiotic restitution in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens*. *Journal of Morphology*, 133(2), 139-165.

58. Daf, O. S., Pagano, A., & Lodé, T. (2006). Taxonomic diversity and sympatry among water frogs from Southern France: evidence for new assemblages. *Amphibia Reptilia*, 27(2), 295.

59. De Meeûs, T., Prugnolle, F., & Agnew, P. (2007). Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(11), 1355-1372.

60. Dedukh, D. V., & Krasikova, A. V. (2017). Methodological approaches for studying the European water frog *Pelophylax esculentus* complex. *Russian Journal of Genetics*, *53*, 843-850.

61. Dedukh, D., & Krasikova, A. (2022). Delete and survive: strategies of programmed genetic material elimination in eukaryotes. *Biological Reviews*, *97*(1), 195-216.

62. Dedukh, D., da Cruz, I., Kneitz, S., Marta, A., Ormanns, J., Tichopád, T., ... & Scharl, M. (2022). Achiasmatic meiosis in the unisexual Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Chromosome Research*, *30*(4), 443-457.

63. Dedukh, D., Litvinchuk, J., Svinin, A., Litvinchuk, S., Rosanov, J., & Krasikova, A. (2019). Variation in hybridogenetic hybrid emergence between populations of water frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. *PLoS One*, *14*(11), e0224759.

64. 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.

65. Dedukh, D., Litvinchuk, S., Rosanov, J., Shabanov, D., & Krasikova, A. (2017). Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in RE systems: results from artificial crossings experiments. *BMC evolutionary biology*, *17*, 1-15.

66. Dedukh, D., Marta, A., Myung, R. Y., Ko, M. H., Choi, D. S., Won, Y. J., & Janko, K. (2023). From asexuality to sexual reproduction: cyclical switch of gametogenic pathways in hybrids depend on ploidy level. *bioRxiv*, 2023-06.

67. Dedukh, D., Mazepa, G., Shabanov, D., Rosanov, J., Litvinchuk, S., Borkin, L., ... & Krasikova, A. (2013). Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine. *BMC genetics*, *14*, 1-20.

68. Dedukh, D., Riumin, S., Chmielewska, M., Rozenblut-Kościsty, B., Kolenda, K., Kaźmierczak, M., ... & Krasikova, A. (2020). Micronuclei in germ cells of hybrid frogs from *Pelophylax esculentus* complex contain gradually eliminated chromosomes. *Scientific reports*, 10(1), 8720.

69. 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), 1-9.

70. Doležálková-Kaštánková, M., Mazepa, G., Jeffries, D. L., Perrin, N., Plötner, M., Plötner, 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), 1633.

71. Doležálková-Kaštánková, M., Pruvost, N., 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), 1-11.

72. Dowling, T. E., & Secor, C. L. (1997). The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual review of Ecology and Systematics*, 28(1), 593-619.

73. Drohvalenko, M., Fedorova, A., & Pustovalova, E. (2019) *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*, 8-10.

74. 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), 61-67.

75. Dubey, S., Maddalena, T., Bonny, L., Jeffries, D. L., & Dufresnes, C. (2019). Population genomics of an exceptional hybridogenetic system of *Pelophylax* water frogs. *BMC evolutionary biology*, *19*, 1-13.

76. Dufresnes, C., & Mazepa, G. (2020). Hybridogenesis in water frogs. *eLS*, *1*, 718-726.

77. 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 VN Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, *37*, 70-78.

78. 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.

79. Fedorova, A., Pustovalova, E., Leliukh, I., Klymenko, R., & Polishchuk, A. (2019). Hemiclinal population system of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from Koryakiv yar pond: results of annual monitoring. *14th International young scientists' conference "Biology: From a Molecule Up to The Biosphere"*, November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine, 172-173.

80. Fedorova, A., Pustovalova, E., & Drohvalenko, M. (2023). High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetological Bulletin*, *164*, 24-25.

81. Fomenko, K. S., Trokhymchuk, R. R., Lukan, R. M., Makaryan, R. N., & Pustovalova, E. S. The study of hemiclinal population system *Pelophylax esculentus* complex from the Lower Dobritskiy pond (the territory of the National Park "Gomolshanski lisy"). «*Біологія: від молекули до біосфери*», матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених (26 листопада–1 грудня 2017 р., м. Харків, Україна), Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна, 152-153.

82. Fukagawa, T., & Earnshaw, W. C. (2014). The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Developmental cell*, *30*(5), 496-508.

83. Giorgi, F., & Galleni, L. (1972). The Lampbrush Chromosomes of *Rana esculenta* L.(Amphibia—Anura). *Caryologia*, 25(2), 107-123.

84. Goulet, B. E., Roda, F., & Hopkins, R. (2017). Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant physiology*, 173(1), 65-78.

85. Graf JD, & Polls-Pelaz M. 1989. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* Complex. In: *Dawley RM, Bogart JP, eds. Evolution and ecology of unisexual vertebrates. Albany, New York: New York State Museum Publications, 289–302.*

86. Graf, J. D., & Mueller, W. P. (1979). Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia*, 35, 1574-1576.

87. Gubányi, A. (1995). Biometrical investigation of water frogs in the Szigetköz Landscape Protection Area. *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 10(1995).

88. Gubanyi, A., & Creemers, R. (1994). Population structure of water frogs in a floodplain of the River Danube [Szigetkoz] in Hungary. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).

89. Gubányi, A., & Korsós, Z. (1992). Morphological analysis of two Hungarian water frog (*Rana lessonae-esculenta*) populations. *Amphibia-Reptilia*, 13(3), 235-242.

90. Gubányi, A., & Pekli, J. (1991). Contribution to the knowledge of green frog populations (*Rana esculenta* complex, Anura, Amphibia) of the Kis-Balaton Landscape Protection Area, Hungary. *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 6, 13-22.

91. Guerrini, F., Bucci, S., Raghianti, M., Mancino, G., Hotz, H., Uzzell, T., & Berger, L. (1997). Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology*, 279(2), 163-176.

92. Guex, G. D., Hotz, H., & Semlitsch, R. D. (2002). Deleterious alleles and differential viability in progeny of natural hemiclonal frogs. *Evolution*, 56(5), 1036-1044.

93. Guex, G. D., Hotz, H., Uzzell, T., Semlitsch, R. D., Beerli, P., & Pascolini, R. (2001). Developmental disturbances in *Rana esculenta* tadpoles and metamorphs. *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 79-86.

94. Günther, R. (1970). Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pall. und das Vorkommen von Triploidie bei *Rana esculenta* L.(Anura, Amphibia). *Biologisches Zentralblatt*, 89(3), 327-342 [Німецькою].

95. Günther, R. (1983) Zur Populationsgenetik der Mitteleuropäischen Wasserfrösche des *Rana esculenta*-Synkleptons (Anura, Ranidae). *Zoologischer Anzeiger*, 211, 43-54 [Німецькою].

96. 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. *Jb Feldherp Beiheft*, 1, 23-46 [Німецькою].

97. Günther, R., Plötner, J., & Tetzlaff, I. (1991). Zu einigen Merkmalen der Wasserfrösche (*Rana synkl. esculenta*) des Donau-Deltas. *Salamandra*, 27(4), 246-265 [Німецькою].

98. Günther, R., Uzzell, T., & Berger, L. (1979). Inheritance patterns in triploid *Rana "esculenta"* (Amphibia, Salientia). *Mitteilungen des Zoologischen Museums Berlin*, 55, 35–57.

99. Haczkiewicz, K., Rozenblut-Kościsty, B., & Ogielska, M. (2017). Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. *Zoology*, 122, 63-79.

100. Hamilton, W. D. (1980). Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos*, 282-290.

101. Harigaya, Y., & Yamamoto, M. (2007). Molecular mechanisms underlying the mitosis–meiosis decision. *Chromosome Research*, 15, 523-537.

102. Hauswaldt, J. S., Hoeer, M., Ogielska, M., Christiansen, D. G., Dziewulska-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.

103. Henry, L., Schwander, T., & Crespi, B. J. (2012). Deleterious mutation accumulation in asexual *Timema* stick insects. *Molecular biology and evolution*, *29*(1), 401-408.

104. 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.

105. 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*, 101-104.

106. Hermaniuk, A., Czajkowska, M., Borkowska, A., & Taylor, J. R. (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.

107. Hertwig, P. (1920). Triploide Froschlarven. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, *94*(1), 34-54.

108. Hoffmann, A., & Reyer, H. U. (2013). Genomic effects on advertisement call structure in diploid and triploid hybrid waterfrogs (Anura, *Pelophylax esculentus*). *BMC ecology*, *13*(1), 1-17.

109. Hoffmann, A., Plötner, J., Pruvost, N. B., Christiansen, D. G., Röthlisberger, S., Choleva, L., ... & 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.

110. Hotz, H., & Uzzell, T. (1983). Interspecific hybrids of *Rana ridibunda* without germ line exclusion of a parental genome. *Experientia*, *39*(5), 538-540.

111. Hotz, H., Mancino, G., Bucciinnocenti, S., Ragghianti, M., Berger, L., & Uzzell, T. (1985). *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology*, 236(2), 199-210.
112. Hotz, H., Semlitsch, R. D., Gutmann, E., Guex, G. D., & Beerli, P. (1999). Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2171-2176.
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.
114. Howe, D. K., & Denver, D. R. (2008). Muller's Ratchet and compensatory mutation in *Caenorhabditis briggsae* mitochondrial genome evolution. *BMC evolutionary biology*, 8, 1-13.
115. Howell, W. T., & Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36(8), 1014-1015.
116. Hubbs, C. L., & Hubbs, L. C. (1932). Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science*, 76(1983), 628-630.
117. Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2016). Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annual review of plant biology*, 67, 421-438.
118. Ishishita, S., Tsuboi, K., Ohishi, N., Tsuchiya, K., & Matsuda, Y. (2015). Abnormal pairing of X and Y sex chromosomes during meiosis I in interspecific hybrids of *Phodopus campbelli* and *P. sungorus*. *Scientific reports*, 5(1), 9435.
119. IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 19/09/2023.

120. Janko, K. (2014). Let us not be unfair to asexuals: Their ephemerality may be explained by neutral models without invoking any evolutionary constraints of asexuality. *Evolution*, 68(2), 569-576.

121. Janko, K., Mikulíček, P., Hobza, R., & Schlupp, I. (2023). Sperm-dependent asexual species and their role in ecology and evolution. *Ecology and Evolution*, 13(10), e10522.

122. Jiang, J. (2019). Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, 27(3), 153-165.

123. Johnson, S. G., & Howard, R. S. (2007). Contrasting patterns of synonymous and nonsynonymous sequence evolution in asexual and sexual freshwater snail lineages. *Evolution*, 61(11), 2728-2735.

124. Joly, P. (2001). The future of the selfish hemiclone: a Neodarwinian approach to water frog evolution. *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 31-38.

125. Juchno, D., Arai, K., Boroń, A., & Kujawa, R. (2017). Meiotic chromosome configurations in oocytes of *Cobitis taenia* and its polyploid hybrids. *Ichthyological Research*, 64, 240-243.

126. Katrushenko, S. (2020). External morphological anomalies of the amphibians of the Kharkiv region. *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*, 34, 78-88.

127. Kimble, J. (2011). Molecular regulation of the mitosis/meiosis decision in multicellular organisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a002683.

128. Kimura-Kawaguchi, M. R., Horita, M., Abe, S., Arai, K., Kawata, M., & Munehara, H. (2014). Identification of hemiclinal reproduction in three species of *Hexagrammos* marine reef fishes. *Journal of Fish Biology*, 85(2), 189-209.

129. Kočí, J., Röslein, J., Pačes, J., Kotusz, J., Halačka, K., Koščo, J., ... & Janko, K. (2020). No evidence for accumulation of deleterious mutations and fitness degradation in clonal fish hybrids: Abandoning sex without regrets. *Molecular Ecology*, 29(16), 3038-3055.

130. Kolenda, K., Pietras-Lebioda, A., Hofman, S., Ogielska, M., & Pabijan, M. (2017). Preliminary genetic data suggest the occurrence of the Balkan water frog, *Pelophylax kurtmuelleri*, in southwestern Poland. *Amphibia-Reptilia*, 38(2), 187-196.
131. Komaru, A., Kawagishi, T., & Konishi, K. (1998). Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution*, 208, 46-50.
132. Komen, H., & Thorgaard, G. H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*, 269(1-4), 150-173.
133. Kondrashov, A. S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336(6198), 435-440.
134. Koref-Santibañez, S. (1979). The karyotypes of *Rana lessonae* Camerano, *Rana ridibunda* Pallas and the hybrid form *Rana" esculenta"* Linne (Anura). *Mitt. Zool. Mus. Berlin.*, 55, 115-124.
135. Koref-Santibanez, S., & Günther, R. (1984). Karyological and serological studies in *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and in their hybrid *R. 'esculenta'* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 52, 195-207.
136. Kotlik, P., & Sulova, K. (1994). Syntopic occurrence of three taxa of water frogs in Czech Republic. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).
137. Krizmanić, I. I., & Ivanović, A. T. (2010). Population systems of the *Pelophylax esculentus* complex in the southern part of its range. *Folia Zoologica*, 59(3), 215-222.
138. 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.
139. Lamatsch, D. K., & Stöck, M. (2009). Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*, 399-432.

140. Lavanchy, G., & Schwander, T. (2019). Hybridogenesis. *Current Biology*, 29(1), R9-R11.
141. Lenormand, T., Engelstädter, J., Johnston, S. E., Wijnker, E., & Haag, C. R. (2016). Evolutionary mysteries in meiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1706), 20160001.
142. Leslie, J. F., & Vrijenhoek, R. C. (1980). Consideration of Muller's ratchet mechanism through studies of genetic linkage and genomic compatibilities in clonally reproducing *Poeciliopsis*. *Evolution*, 1105-1115.
143. Litvinchuk, S. N. (2018). Testicular anomalies in the hybridogenetic frog *Pelophylax esculentus* (Amphibia: Anura: Ranidae). *KnE Life Sciences*, 92-96.
144. Lively, C. M., Craddock, C., & Vrijenhoek, R. C. (1990). Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. *Nature*, 344(6269), 864-866.
145. Lutes, A. A., Neaves, W. B., Baumann, D. P., Wiegraebe, W., & Baumann, P. (2010). Sister chromosome pairing maintains heterozygosity in parthenogenetic lizards. *Nature*, 464(7286), 283-286.
146. 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.
147. Macgregor, H. C., & Uzzell Jr, T. M. (1964). Gynogenesis in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science*, 143(3610), 1043-1045.
148. 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.
149. Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279-283.

150. Mallet, J. (2010). Group selection and the development of the biological species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1547), 1853-1863.

151. Mantovani, B., & Scali, V. (1992). Hybridogenesis and androgenesis in the stick-insect *Bacillus rossius-grandis benazzii* (Insecta, Phasmatodea). *Evolution*, 46(3), 783-796.

152. Marimuthu, M. P., Maruthachalam, R., Bondada, R., Kuppu, S., Tan, E. H., Britt, A., ... & Comai, L. (2021). Epigenetically mismatched parental centromeres trigger genome elimination in hybrids. *Science advances*, 7(47), eabk1151.

153. Marracci, S., Michelotti, V., Guex, G. D., Hotz, H., Uzzell, T., & Ragghianti, 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, 368-382.

154. Marta, A., Tichopad, T., Bartoš, O., Klíma, J., Shah, M., Bohlen, V. Š., ... & Janko, K. (2023). Genetic and karyotype divergence between parents affect clonality and sterility in hybrids. *bioRxiv*, 2023-04.

155. Mayer, M., Hawlitschek, O., Zahn, A., & Glaw, F. (2013). Composition of twenty green frog populations (*Pelophylax*) across Bavaria, Germany. *Salamandra*, 49(1), 31-44.

156. McKee, B. D. (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1677(1-3), 165-180.

157. McKone, M. J., & Halpern, S. L. (2003). The evolution of androgenesis. *The American Naturalist*, 161(4), 641-656.

158. Mezhzherin, S. V., Morozov-Leonov, S. Y., Rostovskaya, O. V., Shabanov, D. A., & Sobolenko, L. Y. (2010). The ploidy and genetic structure of hybrid populations of water frogs *Pelophylax esculentus* complex (Amphibia, Ranidae) of Ukraine fauna. *Cytology and Genetics*, 44, 212-216.

159. Mezhzherin, S., Morozov-Leonov, S., Nekrasova, O., & Rostovskaya, O. (2023). Geographic peculiarities of structure and hemiclone reproduction of *Pelophylax esculentus* water frog complex (Anura, Ranidae) populations in the East European Plain within Ukraine. *Amphibia-Reptilia*, 1(aop), 1-13.

160. 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.

161. Mikulíček, P., Kautman, M., Demovič, B., & Janko, K. (2014). When a clonal genome finds its way back to a sexual species: evidence from ongoing but rare introgression in the hybridogenetic water frog complex. *Journal of evolutionary biology*, 27(3), 628-642.

162. Miller, D. A., Tantravahi, R., Dev, V. G., & Miller, O. J. (1977). Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *American Journal of Human Genetics*, 29(5), 490.

163. Miura, I. (1995). The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura). *Chromosoma*, 103(8), 567-574.

164. Miura, I., Ohtani, H., Nakamura, M., & Saitoh, K. (1997). Fluorescence replication banding of frog chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53, 73-77.

165. Monaco, P. J., Rasch, E. M., & Balsano, J. S. (1984). Apomictic reproduction in the Amazon molly, *Poecilia formosa*, and its triploid hybrids. *Evolutionary genetics of fishes*, 311-328.

166. Morishima, K., Yoshikawa, H., & Arai, K. (2008). Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity*, 100(6), 581-586.

167. Morozov-Leonov, S. Y. (2017). Hemiclone diversity in the hybrid form *Pelophylax esculentus-ridibundus* (Amphibia, Ranidae) from the Tisa river drainage. *Cytology and genetics*, 51, 470-477.

168. Morozov-Leonov, S. Y. (2021a). Evolutionary Potential of the Hybrid Form *Pelophylax esculentus-ridibundus* (Amphibia, Ranidae) within Dnieper and Desna Drainages: Its Loss Caused by the Hemiclonal Inheritance and the Compensatory Role of Parental Genomes' Recombination. *Cytology and Genetics*, 55(3), 213-226.

169. Morozov-Leonov, S. Y. (2021b). Hybrid form *Pelophylax esculentus-ridibundus* (Amphibia, Ranidae) from the Tisa river drainage: its origin and evolutionary potential. *Cytology and Genetics*, 55, 540-547.

170. Morozov-Leonov, S. Y., Mezhzherin, S. V., Nekrasova, O. D., Shabanov, D. A., Korshunov, A. V., & Krutyak, F. F. (2009). Inheritance of parental genomes by a hybrid form *Rana "esculenta"* (Amphibia, Ranidae). *Russian journal of genetics*, 45, 423-429.

171. Musacchio, A., & Desai, A. (2017). A molecular view of kinetochore assembly and function. *Biology*, 6(1), 5.

172. Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual review of genetics*, 35(1), 673-745.

173. Nasmyth, K., Peters, J. M., & Uhlmann, F. (2001, May). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. In *The Cell Cycle and Development: Novartis Foundation Symposium 237* (Vol. 237, pp. 113-138). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

174. Neaves, W. B., & Baumann, P. (2011). Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics*, 27(3), 81-88.

175. Neiman, M., Hehman, G., Miller, J. T., Logsdon Jr, J. M., & Taylor, D. R. (2010). Accelerated mutation accumulation in asexual lineages of a freshwater snail. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 954-963.

176. Newton, A. A., Schnittker, R. R., Yu, Z., Munday, S. S., Baumann, D. P., Neaves, W. B., & Baumann, P. (2016). Widespread failure to complete meiosis does not impair fecundity in parthenogenetic whiptail lizards. *Development*, *143*(23), 4486-4494.
177. Ogielska, M. (2009). Development and reproduction of amphibian species, hybrids, and polyploids. *Reproduction of amphibians*, 343-410.
178. Ogielska, M., & Bartmańska, J. (1999). Development of testes and differentiation of germ cells in water frogs of the *Rana esculenta*-complex (Amphibia, Anura). *Amphibia-reptilia*, *20*(3), 251-263.
179. 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.
180. 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.
181. Ogielska, M., Kubicius, I., Gruszka, K., Odziomek, B., Poreba, M., Indyk, M., ... & Ferenc, M. (1994). Diploid-triploid, predominantly male pure *Rana esculenta* population in Wrocław-Nowy Dom. *Zoologica Poloniae*, *39*(3-4).
182. Ogielska-Nowak, M. (1978). DNA content in erythrocyte nuclei of diploid and triploid green frog hybrid of *Rana esculenta* L. complex. *Zool. Pol*, *27*, 109-115.
183. Ohkura, H. (2015). Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(5), a015859.
184. Orive, M. E., & Krueger-Hadfield, S. A. (2021). Sex and Asex: A clonal lexicon. *Journal of Heredity*, *112*(1), 1-8.
185. Plötner, J. (2005). Die westpaläarktischen Wasserfrösche: von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. *Bielefeld: Laurenti*.

186. 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.

187. 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.

188. Pruvost, N. B., 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.

189. Pustovalova, E., Choleva, L., Shabanov, D., & Dedukh, D. (2022). The high diversity of gametogenic pathways in amphispermic water frog hybrids from Eastern Ukraine. *PeerJ*, 10, e13957.

190. Pustovalova, E., Dedukh, D., Choleva, L., & Shabanov, D. (2023) Evolution of gametogenic pathways in reproduction of hybrid males from *Pelophylax esculentus* complex. *The 14th European Cytogenomics Conference, Montpellier, France, 1-4 July, 2023*, 31.

191. Pustovalova, E., Fedorova, A., Pereslavskaya, K., & Verchoturova, P. (2019). 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, 185-186.

192. Ragghianti M., Bucci S., Guerrini F., & Mancino G. (1999): Characterization of two repetitive DNA families (RrS1 and Rana/Pol III) in the genomes of palaeartic green water frogs. *Ital. J. Zool.* 66, 255-263.

193. 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, 497-506.

194. Ragghianti, M., Marracci, S., Marracci, S., Casola, C., Hotz, H., Guex, G. D., ... & Uzzell, T. (2007). Gametogenesis of intergroup hybrids of hemiclinal frogs. *Genetics Research*, 89(1), 39-45.

195. Rastogi, R. K., Iela, L., Meglio, M. D., Matteo, L. D., Minucci, S., & Izzo-Vitiello, I. (1983). Initiation and kinetic profiles of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta* (Amphibia). *Journal of Zoology*, 201(4), 515-525.

196. Rastogi, R. K., Izzo-Vitiello, I., Di Meglio, M., Di Matteo, L., Franzese, R., Di Costanzo, M. G., ... & Chieffi, G. (1983). Ovarian activity and reproduction in the frog, *Rana esculenta*. *Journal of Zoology*, 200(2), 233-247.

197. Reichel, K., Masson, J. P., Malrieu, F., Arnaud-Haond, S., & Stoeckel, S. (2016). Rare sex or out of reach equilibrium? The dynamics of F IS in partially clonal organisms. *BMC genetics*, 17, 1-16.

198. 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, 1-16.

199. Rhymer, J. M., & Simberloff, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annual review of ecology and systematics*, 27(1), 83-109.

200. Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 351-358.

201. Rybacki, M. (1994). Diploid males of *Rana esculenta* from natural populations in Poland producing diploid spermatozoa. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).

202. Rybacki, M. (1994). Pure populations of a hybrid *Rana esculenta* from the German-Polish Usedom Island. *Zoologica Poloniae*, 39(3-4).

203. Rybacki, M., & Berger, L. (2001). Types of water frog populations (*Rana esculenta* complex) in Poland. *Zoosystematics and Evolution*, 77(1), 51-57.

204. Salas, N., Valetti, J., Grenat, P., Otero, M., & Martino, A. (2014). Meiotic behavior of two polyploid species of genus *Pleurodema* (Anura: Leiuperidae) from central Argentina. *Acta Herpetologica*, 9(1), 109-113.
205. Sanei, M., Pickering, R., Kumke, K., Nasuda, S., & Houben, A. (2011). Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), E498-E505.
206. Sas, I., Kovács, É. H., Covaciu-Marcov, S. D., & Szatmari, P. M. (2010). Southern distribution limit of *Pelophylax lessonae* and the LRE population system in Romania. *Biharean Biologist*, 4(2), 185-188.
207. Sawada, H., Inoue, N., & Iwano, M. (2014). Sexual reproduction in animals and plants. *Springer Nature*.
208. Schardl, C. L., & Craven, K. D. (2003). Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology*, 12(11), 2861-2873.
209. Schartl, M. (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Current opinion in genetics & development*, 14(6), 634-641.
210. Schempp, W., & Schmid, M. (1981). Chromosome banding in amphibia: VI. BrdU-replication patterns in anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*, 83(5), 697-710.
211. Schön, I., Martens, K., & van Dijk, P. (2009). Lost sex. *The evolutionary biology of parthenogenesis*, 1-615.
212. Schultz, R. J. (1967). Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish *Poeciliopsis*. *Science*, 157(3796), 1564-1567.
213. Schwander, T., & Oldroyd, B. P. (2016). Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1706), 20150534.
214. Seguí-Simarro, J. M. (2016). Androgenesis in solanaceae. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 209-244.

215. Semlitsch, R. D., & Reyer, H. U. (1992). Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific competition. *Evolution*, 46(3), 665-676.

216. Shabanov, D., Vladymyrova, M., Leonov, A., Biriuk, O., Kravchenko, M., Mair, Q., ... & Zholtkevych, G. (2020). Simulation as a method for asymptotic system behavior identification (eg water frog hemiclinal population systems). In *Information and Communication Technologies in Education, Research, and Industrial Applications: 15th International Conference, ICTERI 2019, Kherson, Ukraine, June 12–15, 2019, Revised Selected Papers 15* (pp. 392-414). Springer International Publishing.

217. Shabanov, V., Kryvoltsevych, A., Zhadan, A., Podpryatov, O., Fedorova, A., Drohvalenko, M., & Pustovalova, E. (2021). Monitoring of the state of HPS of water frogs located in Lower Dobrytskyi pond. *Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine*, 16-18.

218. Shimizu, Y., Shibata, N., Sakaizumi, M., & Yamashita, M. (2000). Production of diploid eggs through premeiotic endomitosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *Zoological Science*, 17(7), 951-958.

219. Smith, J. M., & Maynard-Smith, J. (1978). *The evolution of sex (Vol. 4)*. Cambridge: Cambridge University Press.

220. Socha, M., & Ogielska, M. (2010). Age structure, size and growth rate of water frogs from central European natural *Pelophylax ridibundus*-*Pelophylax esculentus* mixed populations estimated by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia*, 31(2), 239-250.

221. Som, C., & Reyer, H. U. (2006). Demography and evolution of pure hybridogenetic frog (*Rana esculenta*) populations. *Evolutionary Ecology Research*, 8(7), 1235-1248.

222. Som, C., & Reyer, H. U. (2006). Variation in sex ratio and evolutionary rate of hemiclinal *Rana esculenta* populations. *Evolutionary Ecology*, 20, 159-172.

223. Som, C., & Reyer, H. U. (2007). Hemiclinal reproduction slows down the speed of Muller's ratchet in the hybridogenetic frog *Rana esculenta*. *Journal of evolutionary biology*, 20(2), 650-660.

224. Som, C., Bagheri, H. C., & Reyer, H. U. (2007). Mutation accumulation and fitness effects in hybridogenetic populations: a comparison to sexual and asexual systems. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1-11.

225. Spangenberg, V., Arakelyan, M., Cioffi, M. D. B., Liehr, T., Al-Rikabi, A., Martynova, E., ... & Kolomiets, O. (2020). Cytogenetic mechanisms of unisexuality in rock lizards. *Scientific Reports*, 10(1), 8697.

226. Spasic-Boskovic, O., Krizmanic, I., & Vujosevic, M. (1999). Population composition and genetic variation of water frogs (Anura: Ranidae) from Yugoslavia. *Caryologia*, 52(1-2), 9-20.

227. Steensels, J., Gallone, B., & Verstrepen, K. J. (2021). Interspecific hybridization as a driver of fungal evolution and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 19(8), 485-500.

228. Stenberg, P., & Saura, A. (2009). Cytology of asexual animals. *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*, 63-74.

229. Stepanenko K.R., Biriuk O.V., Pustovalova E.S., Stakh V.O. (2017). Diversity of sperm sizes of water frogs from different hemiclinal population systems. *All-Ukrainian scientific conference «State and biodiversity of ecosystems of Shatsk National Nature Park and other protected areas»*, Lviv: SPOLOM. 105-109 [Українською].

230. Stöck, M., Dedukh, D., Reifová, R., Lamatsch, D. K., Starostová, Z., & Janko, K. (2021). Sex chromosomes in meiotic, hemiclinal, clonal and polyploid hybrid vertebrates: along the 'extended speciation continuum'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200103.

231. Stöck, M., Ustinova, J., Betto-Colliard, C., Scharl, M., Moritz, C., & Perrin, N. (2012). Simultaneous Mendelian and clonal genome transmission in a sexually reproducing, all-triploid vertebrate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1732), 1293-1299.

232. Subramanian, V. V., & Hochwagen, A. (2014). The meiotic checkpoint network: step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016675.

233. Sumner, A. T. (2008). Chromosomes: organization and function. *John Wiley & Sons*.

234. Suriadna, N. M., Mykytynets, G. I., Pupiňš, M., & Gasso, V. Y. (2020). Population systems of Eurasian water frogs (*Pelophylax*) in the south of Ukraine. *Biosystems Diversity*, 28(2), 154-162.

235. Suryadnaya, N. N. (2003). The data on caryology of green frogs (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*, *R. esculenta*) from Ukraine. *Vestnik zoologii*, 37(1), 33-40.

236. Svinin, A. O., Bashinskiy, I. V., Litvinchuk, S. N., Ermakov, O. A., Ivanov, A. Y., Neymark, L. A., ... & Dubois, A. (2020). *Strigea robusta* causes polydactyly and severe forms of Rostand's anomaly P in water frogs. *Parasites & Vectors*, 13(1), 1-11.

237. Svinin, A. O., Dedukh, D. V., Borkin, L. J., Ermakov, O. A., Ivanov, A. Y., Litvinchuk, J. S., ... & Litvinchuk, S. N. (2021). Genetic structure, morphological variation, and gametogenic peculiarities in water frogs (*Pelophylax*) from northeastern European Russia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(3), 646-662.

238. Svinin, A. O., Litvinchuk, S. N., Borkin, L. J., & Rosanov, J. M. (2013). Distribution and population system types of green frogs (*Pelophylax* Fitzinger, 1843) in Mari El Republic. *Curr. Stud. Herpet*, 13(3/4), 137-147. Jakob, 2007

239. Svinin, A., Bashinskiy, I., Ermakov, O., & Litvinchuk, S. (2023). Effects of minimum *Strigea robusta* (Digenea: Strigeidae) cercariae doses and localization of cysts on the anomaly P manifestation in *Pelophylax lessonae* (Anura: Ranidae) tadpoles. *Parasitology Research*, 122(3), 889-894.
240. 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, 75-83.
241. Torgasheva, A. A., & Borodin, P. M. (2016). Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis*. *Scientific Reports*, 6(1), 36564.
242. Tunner, H. G. (1973). Demonstration of the hybrid origin of the common green frog *Rana esculenta* L. *The Science of Nature*, 60, 481-482.
243. Tunner, H. G. (1974). Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation 1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 12(1), 309-314 [Німецькою].
244. Tunner, H. G., & Heppich, S. (1981). Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften*, 68, 207-208.
245. 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.
246. Tunner, H. G., & Heppich-Tunner, S. (1992). Triploid all male offspring from a cross between diploid hybrid frogs. New Trends in Genetics. In *Annual Meeting of the Genetic Society–Tübingen*, 108.
247. Ullerich, F. H. (1967). Weitere Untersuchungen über Chromosomenverhältnisse und DNS-Gehalt bei Anuren (Amphibia). *Chromosoma*, 21, 345-368 [Німецькою].
248. Uzzell, T. (1970). Meiotic mechanisms of naturally occurring unisexual vertebrates. *The American Naturalist*, 104(939), 433-445.

249. 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*, 13-24.
250. Uzzell, T., Berger, L., & Günther, R. (1975). Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia Salientia). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 81-91.
251. Uzzell, T., Günther, R., & Berger, L. (1977). *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: a leaky hybridogenetic system (Amphibia Salientia). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 147-171.
252. Uzzell, T., Hotz, H., & Berger, L. (1980). Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes. *Journal of experimental Zoology*, 214(3), 251-259.
253. Van Dijk, P. (2009). Apomixis: Basics for non-botanists. In *Lost sex: The evolutionary biology of parthenogenesis* (pp. 47-62). Dordrecht: Springer Netherlands.
254. Van Valen, L. (1977). The red queen. *The American Naturalist*, 111(980), 809-810.
255. Vinogradov, A. E. (1998). Male reproductive strategy and decreased longevity. *Acta biotheoretica*, 46(2), 157-160.
256. 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.
257. 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.
258. Vorburger, C. (2001). Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: evidence from hybridogenetic frogs. *Evolution*, 55(11), 2319-2332.

259. Vorburger, C. (2001). Heterozygous fitness effects of clonally transmitted genomes in waterfrogs. *Journal of Evolutionary Biology*, *14*(4), 602-610.
260. Vorburger, C., & Reyer, H. U. (2003). A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs?. *Conservation Genetics*, *4*, 141-155.
261. Wang, J., & Davis, R. E. (2014). Programmed DNA elimination in multicellular organisms. *Current opinion in genetics & development*, *27*, 26-34.
262. Wickbom, T. (1945). Cytological studies on dipnoi, urodela, anura, and emys. *Hereditas*, *31*(3-4), 241-346.
263. Zahoruiko, Ye., Solohub-Yosef, M., Hostkina, T., Fedorova, A., Drohvalenko, M., & Pustovalova, E. (2021). Water frogs from Koriakiv pond: annual monitoring of hemiclinal population system. *Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine*, 24-26.
264. Zaleśna, A., Choleva, L., Ogielska, M., Rábová, M., Marec, F., & Ráb, P. (2011). Evidence for integrity of parental genomes in the diploid hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* by genomic *in situ* hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, *134*(3), 206-212.
265. Zaleśna, A., Florek, M., Rybacki, M., & Ogielska, M. (2017). Variability of NOR patterns in European water frogs of different genome composition and ploidy level. *Comparative Cytogenetics*, *11*(2), 249.
266. Zavadil, V. (1994). On the distribution of water frogs [*Rana esculenta* Synklepton] in the Czech Republic with some notes from this territory. *Zoologica Poloniae*, *39*(3-4).
267. Zhang, J., Sun, M., Zhou, L., Li, Z., Liu, Z., Li, X. Y., ... & Gui, J. F. (2015). Meiosis completion and various sperm responses lead to unisexual and sexual reproduction modes in one clone of polyploid *Carassius gibelio*. *Scientific reports*, *5*(1), 10898.

268. Zickler, D., & Kleckner, N. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.6, a016626.

269. Zong, E., & Fan, G. (1989). The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity*, 62(3), 393-406.

270. Атемасова, Т. А., Гончаров, Г. Л., Зіненко, О. І., Коршунов, О. В., Токарський, В. А., Шабанов, Д. А., & Шандиков, Г. О. (2019). Навчально-польова практика із зоології хребетних. *Навч.-метод. посібник, Харків: ХНУ*, 262 с.

271. Біляєв, І., Бондаренко, Г., Гарбуз, Д., Дрогваленко, М., Серватовська, Є., Сударенко, Ю., ... & Шабанов, Д. (2018). Склад та зміни трьох геміклональних популяційних систем зелених жаб НПП «Гомільшанські ліси». *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій», смт Шацьк, 13–16 вересня 2018 р., Львів, СПОЛОМ*, с. 21.

272. Бірюк, О. В. (2017). Цитогенетичні особливості сперматогенезу у диплоїдних і триплоїдних геміклональних міжвидових гібридів *Pelophylax esculentus* complex дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика, 21 с.

273. 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.

274. Бондарева, А. А., Бибик, Ю. С., Самило, С. М., & Шабанов, Д. А. (2012). Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex.

Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія, (15), 116-123.

275. Бондарєва, А. А., Сєдова, К. В., & Шабанов, Д. А. (2013). Порівняння деяких гематологічних показників диплоїдних та триплоїдних *Pelophylax esculentus*. *Праці українського герпетологічного товариства*, (4), 22-26.

276. Вегерина, А. О., Мелешко, Е. В., Пырина, И. С., Сапожникова, В. А., & Бирюк, О. В. (2013). Определение соотношения диплоидов и триплоидов среди метаморфов зеленых лягушек в Северско-Донецком центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*, (18), 107-113.

277. Горенский, Г. Г., Андреев, Д. А., Онищенко, К. С., & Пустовалова, Э. С. (2017). Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Иськова пруда Змиевского района Харьковской области. *Біологія: від молекули до біосфери, матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених (26 листопада - 1 грудня 2017 р., м. Харків, Україна)*, ФОР Шановалова, Т. М., 132-133.

278. Коршунов, А. В. (2005). Существуют ли в Харьковской области чистые популяционные системы. *Биоразнообразие и роль зооценоза в природных и антропогенных экосистемах: Материалы Международной научной конференции, Издательство ДНУ*, 363-365.

279. Коршунов, А. В. (2008). Экологические особенности биотопического распределения представителей *Pelophylax esculentus* complex в Харьковской области. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: біологія*, (8), 48-57.

280. Коршунов, А. В., & Шабанов, Д. А. (2009) Экологические факторы, влияющие на распространение представителей *Pelophylax*

esculentus complex в Харьковской области. *Биологический вестник*, 13(1–2), 76–83.

281. Коршунов, О. В. (2010). Екологічні закономірності розподілу *Pelophylax esculentus* complex у біотопах басейну верхньої течії ріки Сіверський Донець: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16 «Екологія», 20 с.

282. Кравченко, М. А., & Шабанов, Д. А. (2008) Возможные пути трансформации популяционных систем *Pelophylax esculentus* complex (Ranidae, Anura, Amphibia). *Праці Українського герпетологічного товариства* (1), 15–20.

283. Кравченко, М. А., & Шабанов, Д. А. (2010). Моделирование трансформаций гемиклональных популяционных систем зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex; Amphibia, Ranidae) с помощью рекуррентных разностных уравнений. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія*, (12), 70-82.

284. Кравченко, М. А., Шабанов, Д. А., Владимирова, М. В., & Жолткевич, Г. Н. (2011). Исследование устойчивости гемиклональных популяционных систем гибридогенного комплекса зеленых лягушек при помощи имитационного моделирования. *Biosystems Diversity*, 19(1), 51-64.

285. 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. Пенза: Изд-во «Нисса-Поволжье*, 333-335.

286. Лукан, Р. М., Пустовалова, Е. С., & Бірюк, О. В. (2017). Метод прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків зелених жаб. *Біологія: від молекули до біосфери, матеріали XII Міжнародної конференції молодих учених (26 листопада - 1 грудня 2017 р., м. Харків, Україна)*, ФОП Шаповалова, Т. М., 141-142.

287. Макарян, Р. М., Бірюк, О. В., Коршунов, О. В., Кравченко, М. О., Мелешко, О. В., Трохимчук, Р. Р., & Шабанов, Д. А. (2016). Склад пуголовків зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) в Іськовому ставі (НПП «Гомільшанські ліси»). *Матеріали наукової конференції “Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій” (сmt Шацьк, 8–11 вересня 2016 р.)*, Львів: СПОЛОМ, 61-65.

288. Макгрегор, Г., & Варли, Дж. (1986). Методы работы с хромосомами животных. Пер. с англ., М.: Мир, 286 с.

289. Манило, В. В., Радченко, В. И., & Коршунов, А. В. (2007). Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl. esculenta*) из Харьковской области Украины. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*, 21, 68-73.

290. Медведев, С. И. (1974). Материалы к изучению пищи амфибий в районе среднего течения Северского Донца. *Вестн. зоологии*, 1, 50-59.

291. Межжерин, С. В., & Морозов, Л. С. (1996). Генетический анализ структуры гибридных популяций зеленых лягушек *Rana esculenta* L. complex (Amphibia, Ranidae) Волыни. *Цитология и генетика*, 30(1), 48-53.

292. Межжерин, С. В., & Морозов-Леонов, С. Ю. (1994) Генетические дефекты при наследовании и изменчивость локуса Ldh-B в гибридных популяциях *Rana esculenta* complex (Amphibia, Ranidae). *Известия РАН*, 5, 779- 787.

293. Межжерин, С. В., Морозов-Леонов, С. Ю., Некрасова, О. Д., Куртяк, Ф. Ф., Шабанов, Д. А., & Коршунов, А. В. (2007). Эволюционно-генетические аспекты полуклонального воспроизводства гибридной формы *Rana kl. esculenta* (Amphibia, Ranidae). *Науковий вісник Ужгородського ун-ту: Серія Біологія*, 21, 79–84.

294. Микитинець, Г. І., & Сурядна, Н. М. (2007). Розповсюдження та морфологічні особливості зелених жаб пониззя Дніпра. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*, 21, 85–91

295. Ремінний, В. Ю. (2010). Земноводні Дністровсько-Дніпровської лісостепової провінції: видовий склад, поширення, вікова структура популяцій: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.08 - Зоологія», 20 с.

296. Сомов, Н. Н. (1897). Орнитологическая фауна Харьковской губернии. *Харьков*, 680 с.

297. Сурядна, Н. М. (2005). Зелені жаби фауни України: морфологічна мінливість, каріологія та особливості біології. Канд. дисс. Київ, Інст. зоол. НАН України.

298. Сурядная, Н. Н. (2015). Морфология хромосом триплоидных *Pelophylax esculentus* (Anura, Ranidae) Украины. *Збірник праць Зоологічного музею*.

299. Усова, Е. Е. (2010). Определение естественной смертности половозрелых зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex; Amphibia, Ranidae) с использованием скелетохронологии. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія*, (12), 104-110.

300. Усова, О. Є. (2015). Екологічне значення внутрішньопопуляційного різноманіття онтогенетичних стратегій на прикладі гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex): автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 — екологія, 20 с.

301. Черепашук, И. В., Кочнева, Е. П., Лаврикова, С. С., Левчук, В. Д., Мищеринова, В. О., Мелешко, Е. В., ... & Стоянов, Р. О. (2015). Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Иського пруда Змиевского района Харьковской области. *Біологія: від молекули до біосфери, Матеріали X*

Міжнародної конференції молодих учених (2–4 грудня 2015 р., м. Харків, Україна), Харків, ФОП Шаповалова Т. М., 185–186.

302. Чернай, А. В. (1852). Фауна харьковской губернии и прилежащих к ней мест, составленная по наблюдениям, сделанным во время ученой экспедиции, совершенной в 1848 и 1849 годах. *Фауна земноводных животных и рыб, 1*, 50 с.

303. Шабанов, Д. А. (2015). 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, 36 с.

304. Шабанов, Д. А., & Литвинчук, С. Н. (2010). Зеленые лягушки: жизнь без правил или особый способ эволюции? *Природа, 3*, 29–36.

305. Шабанов, Д. А., Бірюк, О. В., Коршунов, О. В., & Кравченко, М. О. (2017). Поширення різних типів геміклональних популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) у басейні Сіверського Донця. *Сучасний стан та охорона природних комплексів в басейні Сіверського Дінця, Святогірськ*, 139–144.

306. 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), 116–125.

307. Шевченко, Н. Н. (1956). Паразитофауна некоторых видов амфибий и водных рептилий в районе среднего течения р. Северного Донца. *Проблемы паразитологии: Труды II науч. конф. паразитологов УССР*, 117–118.

308. Шевченко, Н. Н., & Василевская, Л. К. (1975). Паразитофауна озерной лягушки биоценоза Печенежского водохранилища и её динамика в разные годы. *Проблемы паразитологии: Материалы VIII науч. конф. паразитологов УССР, 2*, 283–284.

309. Шерстюк, Д. Д., Адонкина, И. В., Винюкова, А. А., Пустовалова, Э. С., & Шевченко, А. С. (2016). Определение ploидности головастиков зеленых лягушек Нижнего Добрицкого пруда (НПП «Гомольшанские леса»). *«Біологія: від молекули до біосфери», матеріали XI Міжнародної конференції молодих учених (29 листопада–2 грудня 2016 р., м. Харків, Україна), Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна, 152-153.*

ДОДАТКИ

ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Публікація у міжнародних наукових виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. **Pustovalova E., Choleva L., Shabanov D., Dedukh D.** The high diversity of gametogenic pathways in amphispermic water frog hybrids from Eastern Ukraine. *PeerJ*. 2022. No. 10. e13957. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.13957> (**Scopus, Web of Science, Q1, IF=3.06**)

Abstract: Interspecific hybridization can disrupt canonical gametogenic pathways, leading to the emergence of clonal and hemiclinal organisms. Such gametogenic alterations usually include genome endoreplication and/or premeiotic elimination of one of the parental genomes. The hybrid frog *Pelophylax esculentus* exploits genome endoreplication and genome elimination to produce haploid gametes with chromosomes of only one parental species. To reproduce, hybrids coexist with one of the parental species and form specific population systems. Here, we investigated the mechanism of spermatogenesis in diploid *P. esculentus* from sympatric populations of *P. ridibundus* using fluorescent *in situ* hybridization. We found that the genome composition and ploidy of germ cells, meiotic cells, and spermatids vary among *P. esculentus* individuals. The spermatogenic patterns observed in various hybrid males suggest the occurrence of at least six diverse germ cell populations, each with a specific premeiotic genome elimination and endoreplication pathway. Besides co-occurring aberrant cells detected during meiosis and gamete aneuploidy, alterations in genome duplication and endoreplication have led to either haploid or diploid sperm production. Diploid *P. esculentus* males from mixed populations of *P. ridibundus* rarely follow classical hybridogenesis. Instead, hybrid

males simultaneously produce gametes with different genome compositions and ploidy levels. The persistence of the studied mixed populations highly relies on gametes containing a genome of the other parental species, *P. lessonae*.

Key words: Amphispermy; Bivalents; FISH; Gametogenesis; Hybridogenesis; Meiosis; *Pelophylax*; Spermatid

URL: <https://peerj.com/articles/13957/>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка самостійно обробила весь матеріал: зафіксувала тканини, провела флуоресцентну гібридизацію in situ на препаратах хромосом та проаналізувала отримані дані, на основі яких описала шляхи гаметогенезу у гібридних самців зелених жаб).

Публікації у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України:

1. Drohvalenko M., Fedorova A., **Pustovalova E.**, Shabanov D. 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. DOI: <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>.

Abstract: *Pelophylax esculentus* is an interspecies hybrid of marsh frog *P. ridibundus* and pool frog *P. lessonae*. The hybrids are usually presented by diploid and triploid forms, and coexist and crossbreed with one or both parental species in the hemiclinal population systems (HPS). Siverskyi Donets river basin is known for its diversity of HPS and was described as Siverskyi Donets center of water frogs diversity. Three subregions were described within it based on the HPS composition features (diploid R-E, triploid-containing R-E-Ep and R-Epf with triploid females only among hybrids). The presence of triploid *P. esculentus* was earlier confirmed only for two of three subregions of the Siverskyi Donets river basin, while the third, R-E subregion (including Mozh river) was thought to be inhabited by only diploids. Here we present the results of analysis on ploidy and genome composition of both adult and juvenile water frogs in a pond in the Tymchenky village (Mozh river basin, Kharkiv region, Ukraine). Three samples of frogs were collect-

ed in September 2019, June 2020, and August 2021 (109 adults and 56 juveniles in total) and analyzed using microscopic erythrocyte cytometry (dry smears), karyology of bone marrow, fluorescent staining (with DAPI) and analysis of morphological features. We identified 2 triploid males among adults and 5 triploids of both sexes among juveniles. The overall triploid ratio between ages changed drastically (9% among juveniles vs 1% among adults), but insignificantly ($p=0.078$). The erythrocyte size indicating margin between adult di- and triploids was established as 28 μm for this system; for juveniles such margin is quite unclear. All triploids had genome composition LLR (i.e. two genomes of *P. lessonae* and one genome of *P. ridibundus*). By the majority of diploid *P. esculentus* and the presence of triploids, Tymchenky system appeared similar to some HPSs (Koriakiv, Iskiv systems) in other subregions, known for triploid presence. The presence of triploids, contrary to previous data on this region, may be explained by several hypotheses: (1) rare observation of triploids; (2) migration of either triploids or *P. esculentus* producing 2n-gametes; (3) a newly evolved feature of local *P. esculentus* reproduction.

Key words: *Pelophylax esculentus*, *Pelophylax ridibundus*, hemiclonal population system, hybrid, triploid

URL: <http://journals.hnpu.edu.ua/index.php/biology/article/view/3834>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: проміри еритроцитів, фіксація тканин; за допомогою методу DAPI зафарбування метафаз мітозу, точно визначила геномну композицію гібридних особин (частину вибірки), базуючись на значеннях інтенсивності забарвлення центромерних ділянок; вперше зареєструвала трипліодних особин у цьому локалітеті)

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>

Abstract: Interspecies hybrid frogs *Pelophylax esculentus* and one of its parental species *Pelophylax ridibundus* inhabit the Siversky Donets center of diversity of water frogs in Eastern Ukraine. These frogs can crossbreed and form progeny in population systems which are called hemiclinal (HPS). Such systems have their own exceptional features which make them interesting for studying. The Lower Dobrytskiy Pond, which is situated in the National Nature Park “Homilshansky lisy” and is a part of Siversky Donets river basin, is on focus. Current work is devoted to the combination of two methods of spermatogenesis investigation. First, using the method of Ag-staining we observed high variability of meiotic chromosomal plates in testes of 24 adult male water frogs *P. esculentus* ($2n=26$). Only one male had 100% of full meiotic plates with no aneuploid plates. A significant amount of studied males (21/24) produced aneuploid chromosomal plates (4-68% of the total amount of meiotic plates). This may lead to a decrease in their fertility or even to their entire sterility. Also, we have not observed any chromosomal meiotic plates in two of 24 males. Some males (8/24) even produced meiotic chromosomal plates with 26 bivalents (i.e. $4n$ germ cells) which may testify about the ability to produce diploid sperm. Further, the lengths of urinary sperm cells' heads were measured. Finally, we performed an analysis of both meiotic chromosomes in testes and the distribution of sizes of urinary sperm cells' heads of hybrid water frogs *Pelophylax esculentus* from Siversky Donets basin to find out if there is a link between these two features. No difference in sperm heads lengths was found between males producing moderate and low amounts of sperm. Based on the data of meiotic plates all males were assigned into five categories via PCA (principal component analysis). A significant difference in sperm heads lengths was found within the category I (males with mostly full meiotic plates). The analysed data shows that each male from the studied population has his own unique features. No direct link between sperm cells size and features of meiotic chromosomes in testes was found.

Key words: *Pelophylax*, sperm, hybrid, chromosome, meiosis, spermatogenesis

URL: <https://periodicals.karazin.ua/biology/article/view/19294>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: фіксація матеріалу, проміри еритроцитів; провела детальний аналіз мейозу гібридних самців і порівняла отримані дані із даними про розміри сперматозоїдів для того, щоб виявити чи відповідає розмір сперми із розподілом метафаз мейозу для кожного самця, і чи можна на основі цих даних відрізнити гаплоїдні і диплоїдні сперматозоїди)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. 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. P. 8-10.

2. Fedorova A., **Pustovalova E.**, Leliukh I., Klymenko R., Polishchuk A. Hemiclonal population system of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from Koryakiv yar pond: results of annual monitoring. 14th International young scientists’ conference “Biology: From a Molecule Up to The Biosphere”, November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine. P. 172-173.

3. **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. P. 185-186.

4. **Pustovalova E.** Sex-success: a case of hybrid male water frogs. SymBioSE-2021 (24th Symposium of Biology Students in Europe, July, Portugal. P. 33.

5. 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. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI

centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 16-18.

6. Zahoruiko Ye., Solohub-Yosef M., Hostkina T., Fedorova A., Drohvalenko M., **Pustovalova E.** Water frogs from Koriakiv pond: annual monitoring of hemiclinal population system. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 24-26.

7. **Pustovalova E.**, Fedorova A., Drohvalenko M. Exploring *Pelophylax esculentus* systems: first records of triploids in the Mozh river basin. Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas, International Zoological Conference, September 9-12, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 13-16

8. **Pustovalova E.**, Dedukh D., Choleva L., Shabanov D. Evolution of gametogenic pathways in reproduction of hybrid males from *Pelophylax esculentus* complex. The 14th European Cytogenomics Conference, Montpellier, France, 1-4 July, 2023. P. 31.

9. Drohvalenko M., Fedorova A., **Pustovalova E.**, Mikulíček P. Molecular data in studies of reproduction in hemiclinal population systems of *Pelophylax esculentus* complex. Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень, матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції, смт. Путила, Чернівецька обл., Україна, 12-13 жовтня, 2023.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. **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, 71(22010), 22010.1-7, 14 April 2022. DOI: <https://doi.org/10.25225/jvb.22010> (**Scopus, Web of Science, Q2, IF=1.46**).

Abstract: We propose a modified and updated protocol to obtain mitotic chromosomes from the regenerated tissue of *Pelophylax* tadpole tail tips. Chromosomal preparations from regenerated tissue results in high-quality and dean slides suitable for further staining and study. Tadpoles remain alive, undergo minimum suffering, and can be grown to adulthood for further investigation. The method could be used for other groups of Anura and modified for other species with the ability to regenerate their tissues.

Key words: karyoanalysis, *Pelophylax*, polyploidy, regeneration

URL: <https://bioone.org/journals/journal-of-vertebrate-biology/volume-71/issue-22010/jvb.22010/Methodology-for-intravital-mitotic-chromosome-preparation-from-regenerated-tissue-derived/10.25225/jvb.22010.full>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу; розробила та вдосконалила метод прижиттєвого отримання хромосом з регенерату хвоста пуголовків)

2. 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*. 29(1), 2022, 204–209. DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.16446>.

Key words: Malformations, brachydactyly, color anomalies, vocalization, population system

URL: <https://journals.ku.edu/reptilesandamphibians/article/view/16446>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу та зареєструвала декілька типів аномалій у зелених жаб із двох локалітетів Сіверсько-Донецького центру різноманіття протягом двох років)

3. 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 (DOI:

10.17161/randa.v29i1.17056). *Reptiles & Amphibians*, 29(1), 2022, 472–474.
DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>

Key words: reproduction, amphibians, anomaly, metamorph, *Pelophylax*, *Pelobates*

URL: <https://journals.ku.edu/reptilesandamphibians/article/view/17056>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у детальному описі аномалій у зелених жаб та часничницях)

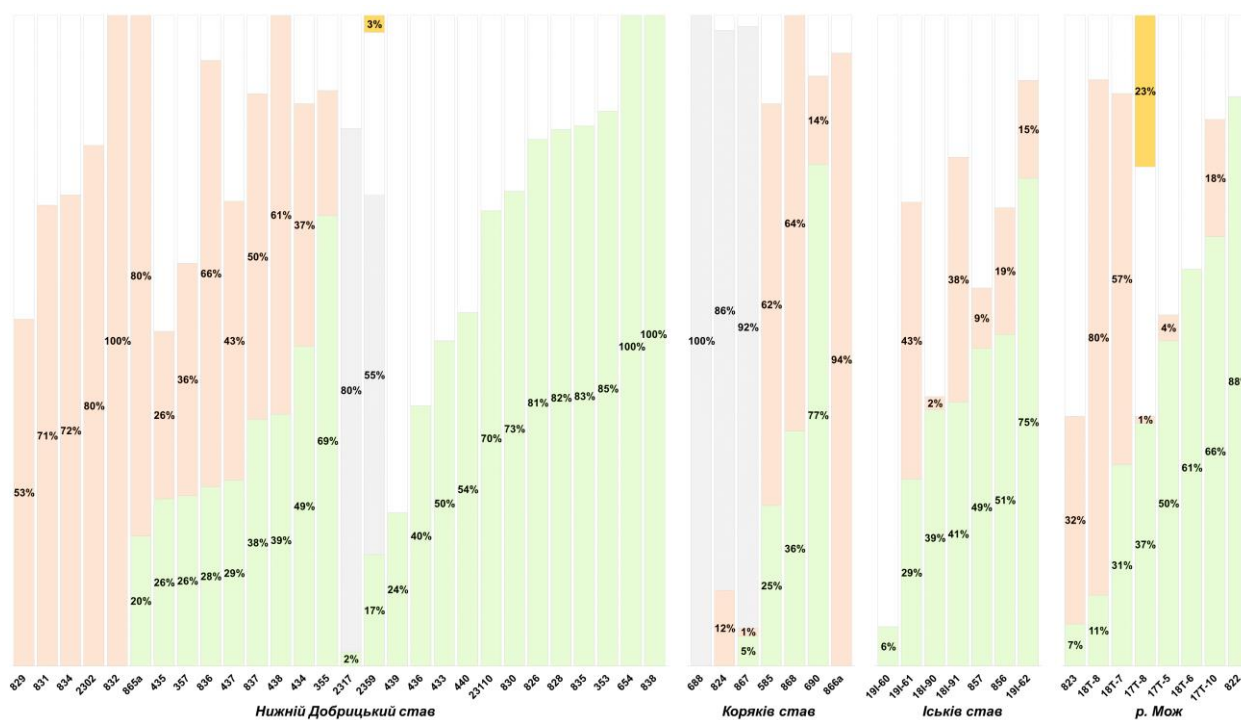
4. Fedorova A., **Pustovalova E.**, Drohvalenko M. High frequency of hindlimb malformation in froglets *Pelophylax* sp. in Ukraine. *Herpetological Bulletin*. 164, 2023, 24-25. DOI: <https://doi.org/10.33256/hb164.2425> (**Scopus, Q3, IF=0.238**)

Key words: anomalies, amphibians, hemimelia, ectromelia, taumelia, *Pelophylax*

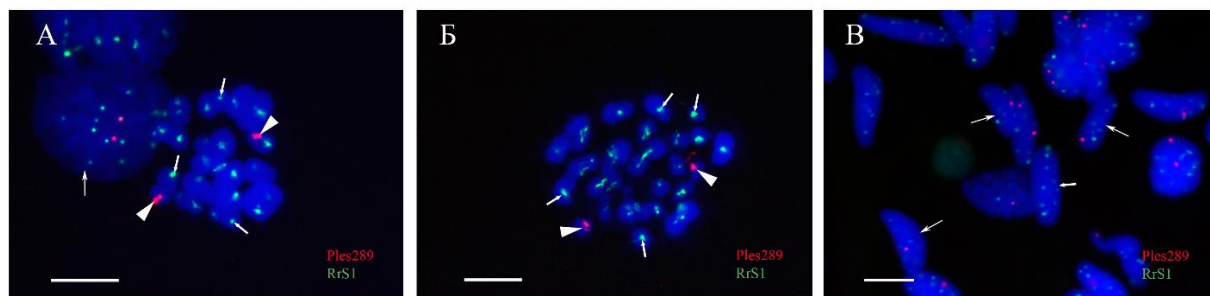
URL: <https://www.thebhs.org/publications/the-herpetological-bulletin/issue-number-164-summer-2023/3799-05-high-frequency-of-hindlimb-malformation-in-froglets-i-pelophylax-i-sp-in-ukraine>

(Особистий внесок здобувача: дисертантка брала участь у камеральній обробці матеріалу: фіксація матеріалу, визначення плоідності особин за допомогою методу Ag-зафарбування клітин із соматичних тканин, який базується на визначенні кількості ядерце-утворюючих районів, а також зафіксувала декілька типів аномалій у цьогорічків зелених жаб)

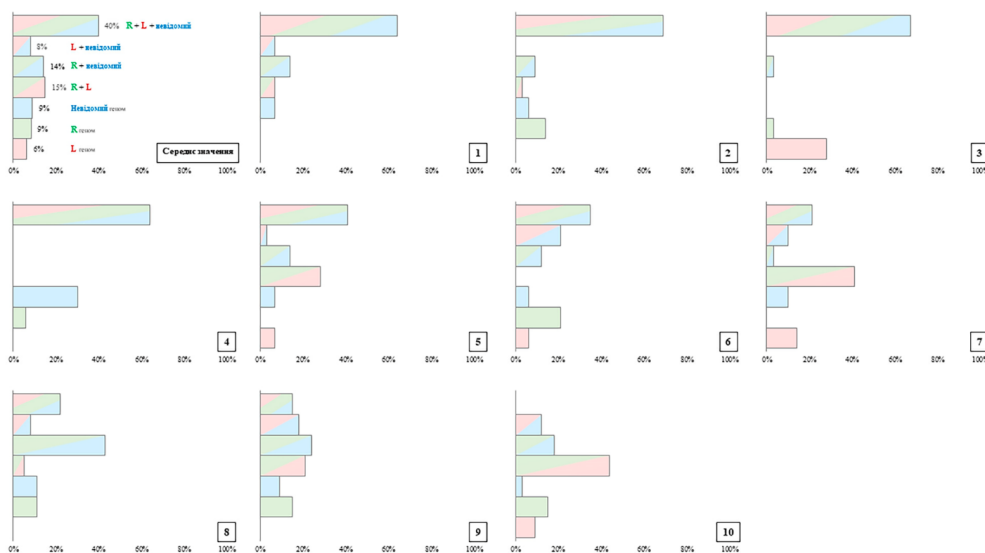
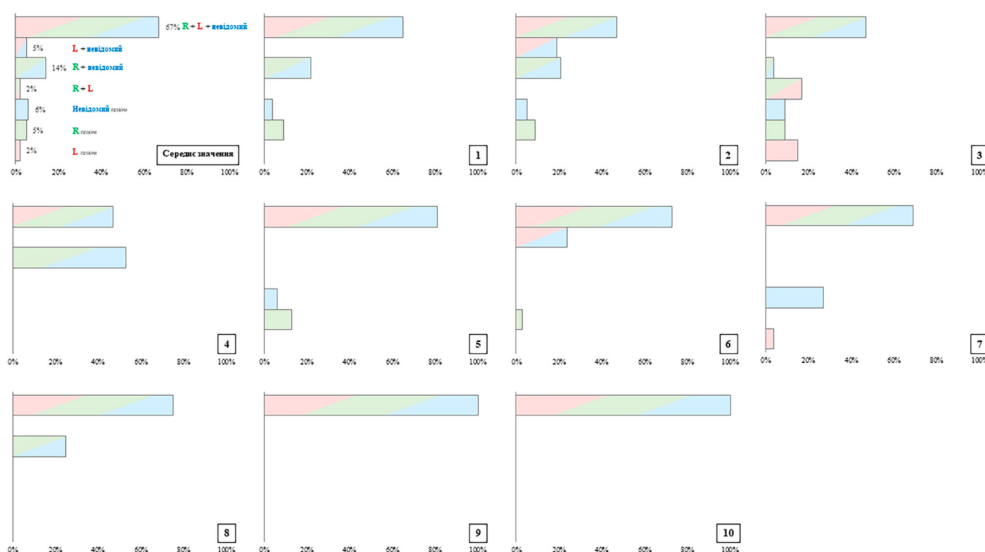
ДОДАТОК Б



Додатковий рис. 1. Відсотковий розподіл нормальних ($2n = 26$) і анеуплоїдних хромосомних пластинок під час мейозу від гібридних жаб, зібраних із різних R-E-ГПС. Зелений колір – мейотичні метафази з геномом *P. ridibundus*, рожевий – мейотичні метафази з геномом *P. lessonae*; жовтий – тетраплоїдні мейотичні метафази; білий – анеуплоїдні мейотичні метафази з геномом *P. ridibundus* та *P. lessonae*.



Додатковий рис. 2. Визначення плоїдності та складу геному в сперматоцитах і сперматидях самців (№2359, №2317) *P. esculentus* із Нижнього Добрицького ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Перичентромерні ділянки на всіх хромосомах *P. ridibundus* мічені за допомогою зонда RrS1 (зелений) і перичентромерні ділянки двох пар хромосом *P. lessonae* мічені за допомогою зонда Ples289 (червоний). Метафаза мейозу (А) з кон'югованими хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*, (Б) з 26 унівалентами *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Сперматиди *P. ridibundus* і *P. lessonae* (В). Стрілки в А, Б вказують на перичентромерний повтор хромосом *P. ridibundus*, наконечники стрілок у А, Б вказують на перичентромерний повтор хромосом *P. lessonae*; тонкі стрілки в А вказують на інтерфазні ядра з хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*; стрілки в В позначають сперматиди з геномом *P. ridibundus*; тонкі стрілки в В позначають анеуплоїдні сперматиди з геномом *P. lessonae*. Масштабна шкала = 10 мкм

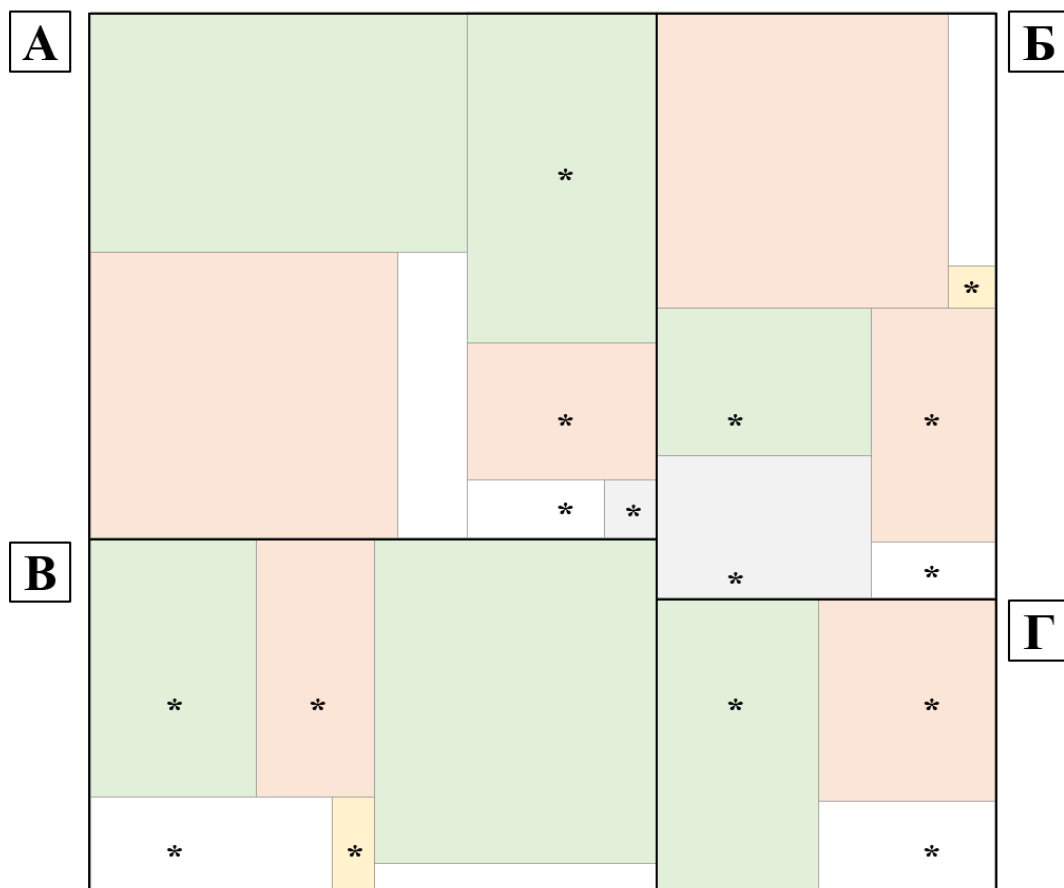
А. Диплоїдний самець *P. esculentus* (№867)Б. Триплоїдний самець *P. esculentus* (№824)

Додатковий рис. 3. Відсотковий розподіл хромосом у двох гібридів після CGH зафарбування. Гібриди (№867, диплоїд, $(2n=26)$ (А); №824, триплоїд $(3n=39)$ (Б)) проаналізовані за допомогою CGH, демонструють явище кон'югації хромосом різних видів у біваленти. На рисунках А і Б вказані графіки з середнім значенням кількості хромосом, зафарбованих у конкретний колір (перший графік із підписом «Середнє значення») для десяти вибірково проаналізованих мейотичних метафаз, які представлені окремими графіками (1-10) Колір забарвлення всього стовпчика відповідає паттерну забарвлення хромосом. Зелений – відсоток хромосом, які

забарвлювались у колір, відповідний геному *P. ridibundus*, червоний – відсоток хромосом, які забарвлювались у колір, відповідний геному *P. lessonae*, синій – відсоток хромосом, які забарвлювались у колір, відмінний від геномів *P. lessonae* або *P. ridibundus*.



Додатковий рис. 4. Фото локалітетів, для яких проводили моніторинг ГПС. А – Нижній Добрицький став, Б – Іськів став, В – Коряків став, Г – заплава р. Мож



Додатковий рис. 5. Загальне припущення щодо внеску гібридних самців у підтримку різних R-E-ГПС. А – Нижній Добрицький став, Б – Ісків став, В – заплава річки Мож, Г – Коряків став. Рожевий – метафази та сперматиди з геномом *P. lessonae*, зелений – метафази та сперматиди з геномом *P. ridibundus*, білий - анеуплоїдні метафази з *P. lessonae* та/або *P. ridibundus* геномом та сперматиди з геномом *P. lessonae*, жовтий - диплоїдні метафази та сперматиди, сірий - метафази з кон'югованими хромосомами *P. ridibundus* і *P. lessonae*; зірочки (*) позначають метафази та сперматиди, які продукують амфіспермічні самці.

ДОДАТОК В

Додаткова таблиця 1

Кількість методів, які використовувалися у дисертації та загальна кількість і тварин, для яких використовували метод

Метод	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	Вид не визначали	Сума
Морфологія	666	50	46	762
Цитометрія еритроцитів	666	50	42	758
Цитометрія сперматозоїдів	11	0	0	11
Отримання хромосом шляхом розкапування соматичних та зародкових клітин	62	0	54	116
Ag-фарбування клітин із соматичних тканин	62	0	54	116
Ag-фарбування клітин із тканин сім'яників	35	0	0	35
DAPI фарбування клітин соматичних тканин	8	0	0	8
FISH на клітинах із соматичних тканин та сім'яників	52	0	0	52
CGH на клітинах із соматичних тканин та сім'яників	4	0	0	4

Додаткова таблиця 2

Список досліджених зелених жаб (*P. esculentus*, *P. ridibundus*) під час моніторингу (2019-2021 рр.) різних

Р-Е-ГПС. Вид, плоідність, стать, локалітет, значення промірів довжини тіла, еритроцитів

Локалітет	Рік збору	Код	Вид	Стать	Довжина тіла, мм	Довжина еритроцитів, мкм	Плоідність	Примітки
Нижній Добрицький став	2019	19D-01	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	22,170	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-02	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	21,190	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-03	<i>P. esculentus</i>	самка	62,5	21,710	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-04	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	23,620	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-05	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	21,960	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-06	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	23,650	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-07	<i>P. esculentus</i>	самка	63,5	24,610	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-08	<i>P. ridibundus</i>	самець	65,2	24,450	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-09	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	25,490	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-10	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	23,490	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-11	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	24,030	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-12	<i>P. ridibundus</i>	самець	71,4	23,500	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-13	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	23,380	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-14	<i>P. esculentus</i>	самка	62,3	27,730	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-15	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	23,960	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-16	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	22,090	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-17	<i>P. esculentus</i>	самець	65,7	22,640	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-18	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	26,430	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-19	<i>P. ridibundus</i>	самка	81,4	23,810	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-20	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	25,130	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-21	<i>P. esculentus</i>	самець	73,6	24,490	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-22	<i>P. esculentus</i>	самець	73,5	25,250	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-23	<i>P. ridibundus</i>	самка	87,8	23,930	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-24	<i>P. ridibundus</i>	самець	68,1	22,870	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-25	<i>P. esculentus</i>	самець	64,6	21,900	2	

Нижній Добрицький став	2019	19D-26	<i>P. esculentus</i>	самка	65,7	24,890	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-27	<i>P. esculentus</i>	самець	63,5	28,670	3	
Нижній Добрицький став	2019	19D-28	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	28,300	3	
Нижній Добрицький став	2019	19D-29	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	25,260	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-30	<i>P. esculentus</i>	самець	67,8	24,030	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-31	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	25,540	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-32	<i>P. esculentus</i>	самець	73,4	23,980	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-33	<i>P. esculentus</i>	самка	84,6	24,220	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-34	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	26,550	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-35	<i>P. esculentus</i>	самець	73,4	25,240	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-36	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	23,510	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-37	<i>P. esculentus</i>	самка	89,2	24,870	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-38	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	24,080	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-39	<i>P. esculentus</i>	самка	53,5	29,280	3	
Нижній Добрицький став	2019	19D-40	<i>P. ridibundus</i>	самка	85,7	24,340	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-41	<i>P. esculentus</i>	не визначали	30,0	23,120	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-42	<i>P. esculentus</i>	не визначали	33,9	27,510	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-43	<i>P. esculentus</i>	не визначали	33,9	25,610	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-44	<i>P. esculentus</i>	не визначали	32,2	27,310	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-45	<i>P. esculentus</i>	не визначали	31,8	23,280	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-46	<i>P. esculentus</i>	не визначали	33,3	24,890	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-47	<i>P. esculentus</i>	не визначали	31,3	25,680	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-48	<i>P. esculentus</i>	не визначали	34,1	26,440	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-49	<i>P. esculentus</i>	не визначали	27,9	23,330	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-50	<i>P. ridibundus</i>	не визначали	27,6	21,910	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-51	<i>P. ridibundus</i>	не визначали	29,0	21,490	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-52	<i>P. ridibundus</i>	не визначали	27,2	23,910	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-53	<i>P. esculentus</i>	не визначали	28,9	20,580	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-54	<i>P. ridibundus</i>	самець	73,1	23,810	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-55	<i>P. ridibundus</i>	самець	68,1	22,710	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-56	<i>P. esculentus</i>	самець	62,4	22,590	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-57	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	23,400	2	

Нижній Добрицький став	2019	19D-58	<i>P. esculentus</i>	самець	74,6	22,460	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-59	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	22,590	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-60	<i>P. esculentus</i>	самець	75,7	22,870	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-61	<i>P. esculentus</i>	самець	77,9	23,900	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-62	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	21,570	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-63	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	24,670	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-64	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	22,010	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-65	<i>P. esculentus</i>	самець	66,8	24,030	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-66	<i>P. esculentus</i>	самець	63,5	25,140	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-67	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	25,270	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-68	<i>P. esculentus</i>	самка	92,4	30,710	3	
Нижній Добрицький став	2019	19D-69	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	24,350	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-70	<i>P. esculentus</i>	самець	76,8	24,770	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-71	<i>P. esculentus</i>	самець	57,9	29,310	3	
Нижній Добрицький став	2019	19D-72	<i>P. esculentus</i>	самець	72,8	26,560	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-73	<i>P. esculentus</i>	самка	86,1	24,410	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-74	<i>P. ridibundus</i>	самка	72,4	24,030	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-75	<i>P. esculentus</i>	самець	64,6	24,000	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-76	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	25,210	2	
Нижній Добрицький став	2019	19D-77	<i>P. esculentus</i>	самець	58,1	26,030	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-01	<i>P. esculentus</i>	самка	54,1	24,467	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-02	<i>P. esculentus</i>	самець	75,4	26,648	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-03	<i>P. esculentus</i>	самець	76,7	24,804	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-04	<i>P. esculentus</i>	самка	82,1	26,723	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-05	<i>P. esculentus</i>	самка	99,0	28,928	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-06	<i>P. esculentus</i>	самець	69,0	26,033	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-07	<i>P. esculentus</i>	самка	87,5	29,668	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-08	<i>P. esculentus</i>	самка	100,1	31,521	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-09	<i>P. esculentus</i>	самець	74,4	25,433	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-10	<i>P. esculentus</i>	самка	89,8	28,698	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-11	<i>P. esculentus</i>	самець	73,5	26,513	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-12	<i>P. esculentus</i>	самець	70,1	25,264	2	

Нижній Добрицький став	2020	20D-13	<i>P. esculentus</i>	самець	65,0	26,083	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-14	<i>P. esculentus</i>	самець	75,6	25,611	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-15	<i>P. esculentus</i>	самець	68,9	26,494	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-16	<i>P. esculentus</i>	самець	69,0	25,567	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-17	<i>P. esculentus</i>	самець	73,5	26,260	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-18	<i>P. esculentus</i>	самка	90,1	31,274	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-19	<i>P. esculentus</i>	самець	74,0	25,882	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-20	<i>P. esculentus</i>	самець	70,1	24,840	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-21	<i>P. esculentus</i>	самець	73,6	30,236	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-22	<i>P. ridibundus</i>	самка	67,5	22,246	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-23	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	24,728	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-24	<i>P. esculentus</i>	самець	75,1	24,290	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-25	<i>P. esculentus</i>	самка	98,0	30,521	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-26	<i>P. ridibundus</i>	самка	58,5	23,030	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-27	<i>P. esculentus</i>	самець	76,0	24,702	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-28	<i>P. esculentus</i>	самець	57,8	23,223	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-29	<i>P. esculentus</i>	самець	71,6	23,245	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-30	<i>P. ridibundus</i>	самець	73,2	24,421	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-31	<i>P. ridibundus</i>	не визначали	45,5	22,868	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-32	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	23,542	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-33	<i>P. esculentus</i>	самець	67,4	32,003	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-34	<i>P. esculentus</i>	самка	92,2	23,241	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-35	<i>P. esculentus</i>	самець	67,1	26,251	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-36	<i>P. esculentus</i>	самець	67,2	26,122	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-37	<i>P. esculentus</i>	самець	74,8	25,277	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-38	<i>P. esculentus</i>	самка	85,9	30,096	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-39	<i>P. esculentus</i>	самець	72,8	31,906	3	
Нижній Добрицький став	2020	20D-40	<i>P. esculentus</i>	самка	79,4	26,345	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-41	<i>P. esculentus</i>	самець	75,2	26,605	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-42	<i>P. ridibundus</i>	самка	80,6	24,329	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-43	<i>P. esculentus</i>	самець	70,4	25,774	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-44	<i>P. esculentus</i>	самка	88,2	30,937	3	

Нижній Добрицький став	2020	20D-45	<i>P. esculentus</i>	самець	70,7	26,303	2	
Нижній Добрицький став	2020	20D-46	<i>P. esculentus</i>	самець	71,7	26,285	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-01	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	25,312	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-02	<i>P. esculentus</i>	самець	68,2	26,117	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-03	<i>P. esculentus</i>	самець	66,2	25,859	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-04	<i>P. esculentus</i>	самець	62,7	25,813	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-05	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	25,518	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-06	<i>P. esculentus</i>	самець	68,7	26,948	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-07	<i>P. ridibundus</i>	самка	65,7	26,839	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-08	<i>P. ridibundus</i>	самка	65,6	25,863	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-09	<i>P. ridibundus</i>	самка	72,2	26,230	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-10	<i>P. ridibundus</i>	самка	76,1	25,194	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-11	<i>P. ridibundus</i>	самка	70,7	24,751	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-12	<i>P. ridibundus</i>	самка	72,8	25,976	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-13	<i>P. ridibundus</i>	самка	76,5	26,420	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-14	<i>P. ridibundus</i>	самка	80,8	24,845	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-15	<i>P. esculentus</i>	самка	59,3	23,188	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-16	<i>P. esculentus</i>	самець	66,9	28,039	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-17	<i>P. ridibundus</i>	самка	63,5	24,320	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-18	<i>P. esculentus</i>	самець	55,5	23,893	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-19	<i>P. esculentus</i>	самець	64,7	30,335	3	
Нижній Добрицький став	2021	21D-20	<i>P. esculentus</i>	самець	72,8	26,194	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-21	<i>P. esculentus</i>	самець	67,3	26,279	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-22	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	24,814	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-23	<i>P. esculentus</i>	самець	63,9	27,866	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-24	<i>P. esculentus?</i>	самець	66,9	26,150	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-25	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	30,947	3	
Нижній Добрицький став	2021	21D-26	<i>P. esculentus</i>	самець	64,4	24,595	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-27	<i>P. esculentus</i>	самець	62,9	23,923	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-28	<i>P. esculentus</i>	самець	65,6	26,193	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-29	<i>P. esculentus</i>	самець	65,1	25,087	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-30	<i>P. esculentus</i>	самець	65,1	23,654	2	

Нижній Добрицький став	2021	21D-31	<i>P. esculentus</i>	самець	61,3	25,451	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-32	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	24,433	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-33	<i>P. esculentus</i>	самець	69,9	24,726	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-34	<i>P. esculentus</i>	самець	76,3	25,445	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-35	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	24,783	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-36	<i>P. esculentus</i>	самка	49,5	21,720	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-37	<i>P. ridibundus</i>	самка	57,6	22,807	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-38	<i>P. esculentus</i>	самка	52,5	28,824	3	
Нижній Добрицький став	2021	21D-39	<i>P. ridibundus</i>	самка	68,4	24,466	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-40	<i>P. ridibundus</i>	самка	66,9	22,778	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-41	<i>P. ridibundus</i>	самка	65,6	23,145	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-42	<i>P. ridibundus</i>	самка	74,7	25,066	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-43	<i>P. esculentus</i>	самець	57,6	25,395	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-44	<i>P. esculentus</i>	самець	60,1	26,143	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-45	<i>P. esculentus</i>	самець	59,9	25,692	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-46	<i>P. esculentus?</i>	самець	69,2	26,795	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-47	<i>P. esculentus</i>	самець	61,5	25,313	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-48	<i>P. esculentus</i>	самець	63,2	26,023	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-49	<i>P. esculentus</i>	самець	62,5	25,440	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-50	<i>P. esculentus?</i>	самець	69,3	24,540	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-51	<i>P. esculentus</i>	самець	79,2	24,551	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-52	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	24,895	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-53	<i>P. esculentus</i>	самець	66,8	23,421	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-54	<i>P. esculentus?</i>	самець	71,6	25,017	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-55	<i>P. esculentus</i>	самка	44,3	22,368	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-56	<i>P. esculentus?</i>	самець	64,5	25,546	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-57	<i>P. esculentus?</i>	самець	67,4	23,947	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-58	<i>P. esculentus</i>	самець	60,1	22,619	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-59	<i>P. esculentus</i>	самець	66,7	24,316	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-60	<i>P. esculentus?</i>	самець	51,9	24,706	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-61	<i>P. esculentus?</i>	самець	64,2	23,501	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-62	<i>P. esculentus</i>	самець	68,2	23,598	2	

Нижній Добрицький став	2021	21D-63	<i>P. esculentus?</i>	самець	59,8	24,509	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-64	<i>P. esculentus?</i>	самець	71,2	24,637	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-65	<i>P. esculentus?</i>	самець	66,4	24,146	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-66	<i>P. esculentus?</i>	самець	59,5	23,694	2	
Нижній Добрицький став	2021	21D-67	<i>P. esculentus</i>	самець	68,4	25,404	2	
Іськів став	2019	19I-01	<i>P. esculentus</i>	самець	66,6	26,400	2	
Іськів став	2019	19I-10	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	25,170	2	
Іськів став	2019	19I-100	<i>P. ridibundus</i>	самка	51,7	23,650	2	
Іськів став	2019	19I-101	<i>P. esculentus</i>	самець	59,5	25,410	2	
Іськів став	2019	19I-102	<i>P. esculentus</i>	самець	69,5			
Іськів став	2019	19I-103	<i>P. esculentus</i>	самець	78,7	24,410	2	
Іськів став	2019	19I-104	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	22,910	2	
Іськів став	2019	19I-105	<i>P. esculentus</i>	самець	55,3	23,400	2	
Іськів став	2019	19I-106	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	22,770	2	
Іськів став	2019	19I-107	<i>P. esculentus</i>	самець	64,6	24,390	2	
Іськів став	2019	19I-108	<i>P. esculentus</i>	самець	62,7	22,900	2	
Іськів став	2019	19I-109	<i>P. esculentus</i>	самець	54,7	24,990	2	
Іськів став	2019	19I-11	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	29,800	3	
Іськів став	2019	19I-110	<i>P. esculentus</i>	самець	59,5	22,800	2	
Іськів став	2019	19I-111	<i>P. esculentus</i>	самець	62,4	25,000	2	
Іськів став	2019	19I-12	<i>P. esculentus</i>	самець	67,5	26,580	2	
Іськів став	2019	19I-13	<i>P. esculentus</i>	самець	68,9	24,830	2	
Іськів став	2019	19I-14	<i>P. esculentus</i>	самець	72,3	23,460	2	
Іськів став	2019	19I-15	<i>P. esculentus</i>	самець	67,5	25,700	2	
Іськів став	2019	19I-16	<i>P. esculentus</i>	самець	67,7	24,690	2	
Іськів став	2019	19I-17	<i>P. esculentus</i>	самець	66,5	26,280	2	
Іськів став	2019	19I-18	<i>P. esculentus</i>	самець	69,8	25,700	2	
Іськів став	2019	19I-19	<i>P. esculentus</i>	самець	73,3	24,710	2	
Іськів став	2019	19I-02	<i>P. esculentus</i>	самець	59,6	25,390	2	
Іськів став	2019	19I-20	<i>P. esculentus</i>	самець	56,7	22,530	2	
Іськів став	2019	19I-21	<i>P. esculentus</i>	самець	64,2	21,570	2	
Іськів став	2019	19I-22	<i>P. esculentus</i>	самець	72,2	24,540	2	

Іськів став	2019	19I-23	<i>P. esculentus</i>	самець	53,1	20,550	2	
Іськів став	2019	19I-24	<i>P. esculentus</i>	самець	60,7	21,320	2	
Іськів став	2019	19I-25	<i>P. esculentus</i>	самець	56,5	21,800	2	
Іськів став	2019	19I-26	<i>P. esculentus</i>	самець	47,8	22,830	2	
Іськів став	2019	19I-27	<i>P. esculentus</i>	самець	63,2	21,970	2	
Іськів став	2019	19I-28	<i>P. esculentus</i>	самець	73,2	24,070	2	
Іськів став	2019	19I-29	<i>P. esculentus</i>	самець	53,6	22,110	2	
Іськів став	2019	19I-03	<i>P. esculentus</i>	самець	61,3	22,880	2	
Іськів став	2019	19I-30	<i>P. esculentus</i>	самець	59,2	21,250	2	
Іськів став	2019	19I-31	<i>P. esculentus</i>	самець	62,9	21,210	2	
Іськів став	2019	19I-32	<i>P. esculentus</i>	самець	66,6	21,410	2	
Іськів став	2019	19I-33	<i>P. esculentus</i>	самець	74,5	24,860	2	
Іськів став	2019	19I-34	<i>P. esculentus</i>	самець	63,6	24,800	2	
Іськів став	2019	19I-35	<i>P. esculentus</i>	самець	74,4	22,940	2	
Іськів став	2019	19I-36	<i>P. esculentus</i>	самець	55,5	20,550	2	
Іськів став	2019	19I-37	<i>P. esculentus</i>	самець	52,7	21,620	2	
Іськів став	2019	19I-38	<i>P. esculentus</i>	самець	76,3	22,910	2	
Іськів став	2019	19I-39	<i>P. esculentus</i>	самець	62,8	22,410	2	
Іськів став	2019	19I-04	<i>P. esculentus</i>	самець	63,3	22,810	2	
Іськів став	2019	19I-40	<i>P. esculentus</i>	самка	61,2	26,450	2	
Іськів став	2019	19I-41	<i>P. esculentus</i>	самець	69,7	24,530	2	
Іськів став	2019	19I-42	<i>P. esculentus</i>	самець	67,2	21,000	2	
Іськів став	2019	19I-43	<i>P. esculentus</i>	самець	56,0	21,470	2	
Іськів став	2019	19I-44	<i>P. esculentus</i>	самець	73,3	24,010	2	
Іськів став	2019	19I-45	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	23,600	2	
Іськів став	2019	19I-46	<i>P. esculentus</i>	самець	71,6	24,170	2	
Іськів став	2019	19I-47	<i>P. esculentus</i>	самець	71,2	23,330	2	
Іськів став	2019	19I-48	<i>P. esculentus</i>	самець	75,4	22,240	2	
Іськів став	2019	19I-49	<i>P. esculentus</i>	самець	63,7	27,080	2	
Іськів став	2019	19I-05	<i>P. esculentus</i>	самець	63,7	23,850	2	
Іськів став	2019	19I-50	<i>P. esculentus</i>	самець	68,6	21,000	2	
Іськів став	2019	19I-51	<i>P. esculentus</i>	самець	60,4	21,870	2	

Іськів став	2019	19I-52	<i>P. esculentus</i>	самець	61,6	21,830	2	
Іськів став	2019	19I-53	<i>P. esculentus</i>	самець	58,0	21,030	2	
Іськів став	2019	19I-54	<i>P. esculentus</i>	самець	67,6	23,430	2	
Іськів став	2019	19I-55	<i>P. esculentus</i>	самець	61,5	21,500	2	
Іськів став	2019	19I-56	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	20,140	2	
Іськів став	2019	19I-57	<i>P. esculentus</i>	самець	70,3	21,930	2	
Іськів став	2019	19I-58	<i>P. esculentus</i>	самець	70,8	22,310	2	
Іськів став	2019	19I-59	<i>P. esculentus</i>	самець	64,0	27,910	2	
Іськів став	2019	19I-06	<i>P. esculentus</i>	самець	74,0	25,880	2	
Іськів став	2019	19I-60	<i>P. esculentus</i>	самець	60,8	21,910	2	
Іськів став	2019	19I-61	<i>P. esculentus</i>	самець	54,3	22,640	2	
Іськів став	2019	19I-62	<i>P. esculentus</i>	самець	69,5	23,680	2	
Іськів став	2019	19I-63	<i>P. esculentus</i>	самець	62,2	24,790	2	
Іськів став	2019	19I-64	<i>P. esculentus</i>	самець	70,4	24,010	2	
Іськів став	2019	19I-65	<i>P. esculentus</i>	самець	66,4	23,650	2	
Іськів став	2019	19I-66	<i>P. esculentus</i>	самець	72,3	29,070	3	
Іськів став	2019	19I-67	<i>P. esculentus</i>	самець	73,7	24,380	2	
Іськів став	2019	19I-68	<i>P. esculentus</i>	самець	60,7	23,330	2	
Іськів став	2019	19I-69	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	24,240	2	
Іськів став	2019	19I-07	<i>P. esculentus</i>	самець	78,2	29,680	3	
Іськів став	2019	19I-70	<i>P. esculentus</i>	самець	55,2	22,490	2	
Іськів став	2019	19I-71	<i>P. esculentus</i>	самець	64,2	24,480	2	
Іськів став	2019	19I-72	<i>P. esculentus</i>	самець	71,2	24,200	2	
Іськів став	2019	19I-73	<i>P. esculentus</i>	самець	61,6	22,580	2	
Іськів став	2019	19I-74	<i>P. esculentus</i>	самець	70,6	23,400	2	
Іськів став	2019	19I-75	<i>P. esculentus</i>	самець	69,4	22,900	2	
Іськів став	2019	19I-76	<i>P. esculentus</i>	самець	65,0	24,730	2	
Іськів став	2019	19I-77	<i>P. esculentus</i>	самець	55,0	23,410	2	
Іськів став	2019	19I-78	<i>P. esculentus</i>	самець	65,3	23,980	2	
Іськів став	2019	19I-79	<i>P. esculentus</i>	самка	62,4	29,050	3	
Іськів став	2019	19I-08	<i>P. esculentus</i>	самець	74,5	24,860	2	
Іськів став	2019	19I-80	<i>P. esculentus</i>	самець	66,9	22,470	2	

Іськів став	2019	19I-81	<i>P. esculentus</i>	самець	53,4	21,340	2	
Іськів став	2019	19I-82	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	26,670	2	
Іськів став	2019	19I-83	<i>P. esculentus</i>	самець	70,4	23,280	2	
Іськів став	2019	19I-84	<i>P. esculentus</i>	самець	63,3	23,760	2	
Іськів став	2019	19I-85	<i>P. esculentus</i>	самець	72,7	24,750	2	
Іськів став	2019	19I-86	<i>P. esculentus</i>	самець	64,4	23,910	2	
Іськів став	2019	19I-87	<i>P. esculentus</i>	самка	78,7	29,960	3	
Іськів став	2019	19I-88	<i>P. esculentus</i>	самець	73,1			
Іськів став	2019	19I-89	<i>P. esculentus</i>	самець	60,1	24,630	2	
Іськів став	2019	19I-09	<i>P. esculentus</i>	самець	67,8	25,170	2	
Іськів став	2019	19I-90	<i>P. esculentus</i>	самець	69,9	25,110	2	
Іськів став	2019	19I-91	<i>P. esculentus</i>	самець	60,3			
Іськів став	2019	19I-92	<i>P. esculentus</i>	самець	64,9	23,480	2	
Іськів став	2019	19I-93	<i>P. esculentus</i>	самець	62,2	23,280	2	
Іськів став	2019	19I-94	<i>P. esculentus</i>	самець	53,4			
Іськів став	2019	19I-95	<i>P. esculentus</i>	самець	63,6	23,810	2	
Іськів став	2019	19I-96	<i>P. esculentus</i>	самець	75,7	23,230	2	
Іськів став	2019	19I-97	<i>P. esculentus</i>	самець	60,8	24,260	2	
Іськів став	2019	19I-98	<i>P. esculentus</i>	самець	74,7	24,010	2	
Іськів став	2019	19I-99	<i>P. esculentus</i>	самка	73,3	28,340	3	
Коряків став	2019	19K-01	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	22,140	2	
Коряків став	2019	19K-02	<i>P. esculentus</i>	самець	75,3	24,620	2	
Коряків став	2019	19K-03	<i>P. esculentus</i>	самець	67,4	25,360	2	
Коряків став	2019	19K-04	<i>P. esculentus</i>	самець	66,2	23,830	2	
Коряків став	2019	19K-05	<i>P. esculentus</i>	самець	65,5	23,610	2	
Коряків став	2019	19K-06	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	25,050	2	
Коряків став	2019	19K-07	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	24,310	2	
Коряків став	2019	19K-08	<i>P. esculentus</i>	самець	65,4	24,300	2	
Коряків став	2019	19K-09	<i>P. esculentus</i>	самець	67,2	20,760	2	
Коряків став	2019	19K-10	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	26,380	2	
Коряків став	2019	19K-100	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	25,050	2	
Коряків став	2019	19K-101	<i>P. esculentus</i>	самець	66,5	26,160	2	

Коряків став	2019	19К-102	<i>P. esculentus</i>	самець	69,0	23,360	2	
Коряків став	2019	19К-103	<i>P. esculentus</i>	самка	58,7	24,430	2	
Коряків став	2019	19К-104	<i>P. esculentus</i>	самець	77,3	26,870	2	
Коряків став	2019	19К-106	<i>P. esculentus</i>	самець	75,6	23,530	2	
Коряків став	2019	19К-107	<i>P. esculentus</i>	самець	74,2	26,320	2	
Коряків став	2019	19К-108	<i>P. esculentus</i>	самець	59,6	23,480	2	
Коряків став	2019	19К-109	<i>P. esculentus</i>	самець	58,5	25,360	2	
Коряків став	2019	19К-11	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	24,280	2	
Коряків став	2019	19К-110	<i>P. esculentus</i>	самець	59,7	28,480	3	
Коряків став	2019	19К-111	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	25,760	2	
Коряків став	2019	19К-112	<i>P. esculentus</i>	самець	79,0	26,350	2	
Коряків став	2019	19К-113	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	25,680	2	
Коряків став	2019	19К-114	<i>P. esculentus</i>	самець	78,0	24,960	2	
Коряків став	2019	19К-115	<i>P. esculentus</i>	самець	72,5	25,660	2	
Коряків став	2019	19К-116	<i>P. esculentus</i>	самець	79,8	25,000	2	
Коряків став	2019	19К-117	<i>P. esculentus</i>	самець	70,3	25,620	2	
Коряків став	2019	19К-118	<i>P. esculentus</i>	самка	83,3	23,050	2	
Коряків став	2019	19К-119	<i>P. esculentus</i>	самець	76,9	26,950	2	
Коряків став	2019	19К-12	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	24,600	2	
Коряків став	2019	19К-120	<i>P. esculentus</i>	самець	77,5	28,740	3	
Коряків став	2019	19К-121	<i>P. esculentus</i>	самець	60,7	23,690	2	
Коряків став	2019	19К-122	<i>P. esculentus</i>	самець	72,5	24,960	2	
Коряків став	2019	19К-123	<i>P. esculentus</i>	самка	56,3	25,840	2	
Коряків став	2019	19К-124	<i>P. esculentus</i>	самка	69,5	24,900	2	
Коряків став	2019	19К-125	<i>P. esculentus</i>	самець	68,8	26,110	2	
Коряків став	2019	19К-126	<i>P. esculentus</i>	самець	72,5	25,990	2	
Коряків став	2019	19К-127	<i>P. esculentus</i>	самець	72,3	26,980	2	
Коряків став	2019	19К-13	<i>P. esculentus</i>	самець	68,3	25,000	2	
Коряків став	2019	19К-14	<i>P. esculentus</i>	самець	79,0	25,810	2	
Коряків став	2019	19К-15	<i>P. esculentus</i>	самець	69,5	24,110	2	
Коряків став	2019	19К-16	<i>P. esculentus</i>	самець	65,6	25,930	2	
Коряків став	2019	19К-17	<i>P. esculentus</i>	самець	71,2	31,530	2	

Коряків став	2019	19К-18	<i>P. esculentus</i>	самець	67,5	26,110	2	
Коряків став	2019	19К-19	<i>P. esculentus</i>	самець	63,5	29,250	3	
Коряків став	2019	19К-20	<i>P. esculentus</i>	самець	65,9	26,420	2	
Коряків став	2019	19К-21	<i>P. esculentus</i>	самець	58,0	26,860	2	
Коряків став	2019	19К-22	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	23,320	2	
Коряків став	2019	19К-23	<i>P. esculentus</i>	самець	65,5	24,500	2	
Коряків став	2019	19К-24	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	23,230	2	
Коряків став	2019	19К-25	<i>P. esculentus</i>	самець	65,0	25,930	2	
Коряків став	2019	19К-26	<i>P. esculentus</i>	самець	72,0	24,240	2	
Коряків став	2019	19К-27	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	24,840	2	
Коряків став	2019	19К-28	<i>P. esculentus</i>	самець	72,9	25,180	2	
Коряків став	2019	19К-29	<i>P. esculentus</i>	не визначали	54,3	21,930	2	
Коряків став	2019	19К-30	<i>P. esculentus</i>	самець	59,5	23,180	2	
Коряків став	2019	19К-31	<i>P. esculentus</i>	самець	60,6	22,800	2	
Коряків став	2019	19К-32	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	23,830	2	
Коряків став	2019	19К-33	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	24,460	2	
Коряків став	2019	19К-34	<i>P. esculentus</i>	самка	86,5	29,480	3	
Коряків став	2019	19К-35	<i>P. esculentus</i>	самець	63,4	23,500	2	
Коряків став	2019	19К-36	<i>P. esculentus</i>	не визначали	47,8	23,240	2	
Коряків став	2019	19К-37	<i>P. esculentus</i>	самець	63,1	25,300	2	
Коряків став	2019	19К-38	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	25,650	2	
Коряків став	2019	19К-39	<i>P. esculentus</i>	самка	72,3	27,930	2	
Коряків став	2019	19К-40	<i>P. esculentus</i>	самець	52,0	28,810	3	
Коряків став	2019	19К-41	<i>P. esculentus</i>	самка	81,3	24,340	2	
Коряків став	2019	19К-42	<i>P. esculentus</i>	не визначали	55,4	21,930	2	
Коряків став	2019	19К-43	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	24,610	2	
Коряків став	2019	19К-44	<i>P. esculentus</i>	самець	69,0	24,040	2	
Коряків став	2019	19К-45	<i>P. esculentus</i>	самець	73,5	24,680	2	
Коряків став	2019	19К-46	<i>P. esculentus</i>	не визначали	52,5	28,710	3	
Коряків став	2019	19К-47	<i>P. esculentus</i>	самець	60,5	29,830	3	
Коряків став	2019	19К-48	<i>P. esculentus</i>	самець	72,0	24,170	2	
Коряків став	2019	19К-49	<i>P. esculentus</i>	самець	66,1	22,320	2	

Коряків став	2019	19К-50	<i>P. ridibundus</i>	самка	96,3	23,900	2	
Коряків став	2019	19К-51	<i>P. esculentus</i>	самець	69,5	25,380	2	
Коряків став	2019	19К-52	<i>P. esculentus</i>	самець	65,7	23,940	2	
Коряків став	2019	19К-53	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	23,730	2	
Коряків став	2019	19К-54	<i>P. esculentus</i>	самець	61,0	25,340	2	
Коряків став	2019	19К-55	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	26,240	2	
Коряків став	2019	19К-56	<i>P. esculentus</i>	самець	71,1	25,270	2	
Коряків став	2019	19К-57	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	21,280	2	
Коряків став	2019	19К-58	<i>P. esculentus</i>	самка	59,0	29,330	3	
Коряків став	2019	19К-59	<i>P. esculentus</i>	самець	51,0	21,210	2	
Коряків став	2019	19К-60	<i>P. esculentus</i>	самець	72,0	27,020	2	
Коряків став	2019	19К-61	<i>P. esculentus</i>	не визначали	56,7	24,500	2	
Коряків став	2019	19К-62	<i>P. esculentus</i>	самець	71,5	24,740	2	
Коряків став	2019	19К-63	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	25,280	2	
Коряків став	2019	19К-64	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	23,600	2	
Коряків став	2019	19К-65	<i>P. esculentus</i>	самець	73,0	25,390	2	
Коряків став	2019	19К-66	<i>P. esculentus</i>	самець	63,0	23,710	2	
Коряків став	2019	19К-67	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	24,130	2	
Коряків став	2019	19К-68	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	24,600	2	
Коряків став	2019	19К-69	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	25,060	2	
Коряків став	2019	19К-70	<i>P. esculentus</i>	самець	65,3	26,730	2	
Коряків став	2019	19К-71	<i>P. esculentus</i>	самець	71,7	26,470	2	
Коряків став	2019	19К-72	<i>P. esculentus</i>	самець	71,7	25,360	2	
Коряків став	2019	19К-73	<i>P. esculentus</i>	самець	69,0	25,790	2	
Коряків став	2019	19К-74	<i>P. esculentus</i>	самець	58,0	27,570	2	
Коряків став	2019	19К-75	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	27,150	2	
Коряків став	2019	19К-76	<i>P. esculentus</i>	самець	65,0	26,300	2	
Коряків став	2019	19К-77	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	25,830	2	
Коряків став	2019	19К-78	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	27,070	2	
Коряків став	2019	19К-79	<i>P. esculentus</i>	самець	68,9	23,390	2	
Коряків став	2019	19К-80	<i>P. esculentus</i>	самець	71,6	25,510	2	
Коряків став	2019	19К-81	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	24,900	2	

Коряків став	2019	19К-82	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	24,540	2	
Коряків став	2019	19К-83	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	25,170	2	
Коряків став	2019	19К-84	<i>P. esculentus</i>	самець	65,1	23,630	2	
Коряків став	2019	19К-85	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	26,050	2	
Коряків став	2019	19К-86	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	24,080	2	
Коряків став	2019	19К-87	<i>P. esculentus</i>	самець	78,0	27,970	2	
Коряків став	2019	19К-88	<i>P. esculentus</i>	самець	83,2	23,840	2	
Коряків став	2019	19К-89	<i>P. esculentus</i>	самець	62,2	23,550	2	
Коряків став	2019	19К-90	<i>P. esculentus</i>	самець	74,3	23,830	2	
Коряків став	2019	19К-91	<i>P. esculentus</i>	самка	78,4	25,620	2	
Коряків став	2019	19К-92	<i>P. esculentus</i>	самка	62,1	22,240	2	
Коряків став	2019	19К-93	<i>P. esculentus</i>	самець	80,5	24,500	2	
Коряків став	2019	19К-94	<i>P. esculentus</i>	самка	86,9	27,890	2	
Коряків став	2019	19К-95	<i>P. esculentus</i>	самець	71,3	30,410	3	
Коряків став	2019	19К-96	<i>P. esculentus</i>	самець	72,7	24,440	2	
Коряків став	2019	19К-97	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	25,310	2	
Коряків став	2019	19К-98	<i>P. esculentus</i>	самець	70,3	26,500	2	
Коряків став	2019	19К-99	<i>P. esculentus</i>	самець	68,1	24,570	2	
Коряків став	2020	20К-02	<i>P. esculentus</i>	самець	74,6	25,300	2	
Коряків став	2020	20К-03	<i>P. esculentus</i>	самка	62,1	24,830	2	
Коряків став	2020	20К-04	<i>P. esculentus</i>	самець	62,3	24,040	2	
Коряків став	2020	20К-05	<i>P. esculentus</i>	самець	71,4	23,810	2	
Коряків став	2020	20К-06	<i>P. esculentus</i>	самка	92,5	24,450	2	
Коряків став	2020	20К-07	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	25,350	2	
Коряків став	2020	20К-08	<i>P. ridibundus</i>	самка	96,3	23,440	2	
Коряків став	2020	20К-09	<i>P. esculentus</i>	самець	75,6	26,650	2	
Коряків став	2020	20К-10	<i>P. esculentus</i>	самець	76,5	25,630	2	
Коряків став	2020	20К-11	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	24,860	2	
Коряків став	2020	20К-12	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	26,340	2	
Коряків став	2020	20К-13	<i>P. esculentus</i>	самець	57,0	22,170	2	
Коряків став	2020	20К-14	<i>P. esculentus</i>	самець	68,3	24,050	2	
Коряків став	2020	20К-15	<i>P. esculentus</i>	самка	56,4	29,250	3	

Коряків став	2020	20К-16	<i>P. esculentus</i>	самець	62,4	25,150	2	
Коряків став	2020	20К-17	<i>P. esculentus</i>	самка	48,6	22,650	2	
Коряків став	2020	20К-18	<i>P. esculentus</i>	самець	65,3	25,050	2	
Коряків став	2020	20К-19	<i>P. esculentus</i>	самець	55,0	23,070	2	
Коряків став	2020	20К-20	<i>P. esculentus</i>	самка	52,3	22,860	2	
Коряків став	2020	20К-21	<i>P. esculentus</i>	самець	56,8	24,480	2	
Коряків став	2020	20К-22	<i>P. esculentus</i>	самець	56,2	23,580	2	
Коряків став	2020	20К-23	<i>P. esculentus</i>	самка	52,2	24,400	2	
Коряків став	2020	20К-24	<i>P. esculentus</i>	самець	54,1	24,020	2	
Коряків став	2020	20К-25	<i>P. esculentus</i>	не визначали	43,4	23,970	2	
Коряків став	2020	20К-26	<i>P. esculentus</i>	самець	51,1	24,130	2	
Коряків став	2020	20К-27	<i>P. esculentus</i>	не визначали	47,0	24,110	2	
Коряків став	2020	20К-28	<i>P. esculentus</i>	самка	47,5	22,240	2	
Коряків став	2020	20К-29	<i>P. esculentus</i>	не визначали	48,3	23,710	2	
Коряків став	2020	20К-30	<i>P. esculentus</i>	не визначали	43,1	21,670	2	
Коряків став	2020	20К-31	<i>P. esculentus</i>	не визначали	41,3	27,310	2	
Коряків став	2020	20К-32	<i>P. esculentus</i>	не визначали	45,2	28,450	2	
Коряків став	2020	20К-33	<i>P. esculentus</i>	не визначали	40,6	24,660	2	
Коряків став	2020	20К-34	<i>P. esculentus</i>	не визначали	44,4	22,870	2	
Коряків став	2020	20К-35	<i>P. esculentus</i>	не визначали	40,4	21,970	2	
Коряків став	2020	20К-36	<i>P. esculentus</i>	самець	63,9	26,540	2	
Коряків став	2020	20К-37	<i>P. esculentus</i>	самець	63,7	28,130	3	
Коряків став	2021	21К-01	<i>P. esculentus</i>	самка	93,4	22,890	2	
Коряків став	2021	21К-02	<i>P. esculentus</i>	самець	62,6	23,380	2	
Коряків став	2021	21К-03	<i>P. esculentus</i>	самець	55,8	21,560	2	
Коряків став	2021	21К-04	<i>P. esculentus</i>	самець	48,8	23,220	2	
Коряків став	2021	21К-05	<i>P. esculentus</i>	самець	52,3	23,550	2	
Коряків став	2021	21К-06	<i>P. esculentus</i>	самець	51,0	23,670	2	
Коряків став	2021	21К-07	<i>P. esculentus</i>	самець	49,6	24,580	2	
Коряків став	2021	21К-08	<i>P. esculentus</i>	самка	52,0	20,590	2	
Коряків став	2021	21К-09	<i>P. esculentus</i>	самка	52,1	23,170	2	
Коряків став	2021	21К-10	<i>P. esculentus</i>	самець	50,8	22,880	2	

Коряків став	2021	21К-100	<i>P. esculentus</i>	самець	51,7	22,070	2	
Коряків став	2021	21К-101	<i>P. esculentus</i>	самка	50,4	26,710	2	
Коряків став	2021	21К-102	<i>P. esculentus</i>	самець	51,1	24,070	2	
Коряків став	2021	21К-103	<i>P. esculentus</i>	самець	49,1	23,480	2	
Коряків став	2021	21К-104	<i>P. esculentus</i>	самець	50,5	19,790	2	
Коряків став	2021	21К-105	<i>P. esculentus</i>	самець	51,6	21,910	2	
Коряків став	2021	21К-106	<i>P. esculentus</i>	самець	55,3	19,380	2	
Коряків став	2021	21К-107	<i>P. esculentus</i>	самка	35,9	18,330	2	
Коряків став	2021	21К-108	<i>P. esculentus</i>	самець	52,2	21,110	2	
Коряків став	2021	21К-109	<i>P. esculentus</i>	самець	45,3	18,990	2	
Коряків став	2021	21К-11	<i>P. esculentus</i>	самець	53,3	23,790	2	
Коряків став	2021	21К-110	<i>P. esculentus</i>	самець	48,4	21,020	2	
Коряків став	2021	21К-111	<i>P. esculentus</i>	самка	50,8	24,370	2	
Коряків став	2021	21К-112	<i>P. ridibundus</i>	самець	43,3	20,080	2	
Коряків став	2021	21К-113	<i>P. esculentus</i>	самець	46,2	20,110	2	
Коряків став	2021	21К-114	<i>P. esculentus</i>	самка	54,3	21,020	2	
Коряків став	2021	21К-115	<i>P. esculentus</i>	самка	50,6	25,230	2	
Коряків став	2021	21К-116	<i>P. esculentus</i>	самець	52,7	26,740	2	
Коряків став	2021	21К-117	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	24,790	2	
Коряків став	2021	21К-118	<i>P. esculentus</i>	самець	57,9	21,890	2	
Коряків став	2021	21К-119	<i>P. esculentus</i>	самець	52,1	22,510	2	
Коряків став	2021	21К-12	<i>P. esculentus</i>	самець	63,6	25,550	2	
Коряків став	2021	21К-120	<i>P. esculentus</i>	самець	53,0	22,790	2	
Коряків став	2021	21К-121	<i>P. esculentus</i>	самець	50,5	23,430	2	
Коряків став	2021	21К-122	<i>P. esculentus</i>	самець	48,9	22,190	2	
Коряків став	2021	21К-123	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	23,280	2	
Коряків став	2021	21К-124	<i>P. esculentus</i>	самець	67,1	25,460	2	
Коряків став	2021	21К-13	<i>P. esculentus</i>	самець	69,8	23,390	2	
Коряків став	2021	21К-14	<i>P. esculentus</i>	самка	48,3	29,400	3	
Коряків став	2021	21К-15	<i>P. esculentus</i>	самець	56,4	22,730	2	
Коряків став	2021	21К-16	<i>P. esculentus</i>	самець	62,8	32,010	3	
Коряків став	2021	21К-17	<i>P. esculentus</i>	самець	64,2	22,870	2	

Коряків став	2021	21К-18	<i>P. esculentus</i>	самець	65,0	32,480	3	
Коряків став	2021	21К-19	<i>P. esculentus</i>	самець	62,8	25,540	2	
Коряків став	2021	21К-20	<i>P. esculentus</i>	самець	53,3	23,860	2	
Коряків став	2021	21К-21	<i>P. esculentus</i>	самець	74,7	32,070	3	
Коряків став	2021	21К-22	<i>P. esculentus</i>	самець	60,9	25,020	2	
Коряків став	2021	21К-23	<i>P. esculentus</i>	самець	68,2	23,950	2	
Коряків став	2021	21К-24	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	25,000	2	
Коряків став	2021	21К-25	<i>P. esculentus</i>	самець	63,9	31,810	3	
Коряків став	2021	21К-26	<i>P. esculentus</i>	самка	82,2	31,010	3	
Коряків став	2021	21К-27	<i>P. esculentus</i>	самець	73,9	25,240	2	
Коряків став	2021	21К-28	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	25,220	2	
Коряків став	2021	21К-29	<i>P. esculentus</i>	самка	52,8	24,620	2	
Коряків став	2021	21К-30	<i>P. esculentus</i>	самець	74,1	24,770	2	
Коряків став	2021	21К-31	<i>P. esculentus</i>	самка	51,3	22,870	2	
Коряків став	2021	21К-32	<i>P. esculentus</i>	самець	57,9	23,880	2	
Коряків став	2021	21К-33	<i>P. esculentus</i>	самець	50,0	24,610	2	
Коряків став	2021	21К-34	<i>P. esculentus</i>	самець	38,6	23,180	2	
Коряків став	2021	21К-35	<i>P. esculentus</i>	самець	62,7	24,340	2	
Коряків став	2021	21К-36	<i>P. esculentus</i>	самка	79,0	31,420	3	
Коряків став	2021	21К-37	<i>P. esculentus</i>	самка	58,1	22,890	2	
Коряків став	2021	21К-38	<i>P. esculentus</i>	самка	60,7	24,140	2	
Коряків став	2021	21К-39	<i>P. esculentus</i>	самець	53,2	23,960	2	
Коряків став	2021	21К-40	<i>P. esculentus</i>	самець	55,1	23,850	2	
Коряків став	2021	21К-41	<i>P. esculentus</i>	самець	72,7	30,560	3	
Коряків став	2021	21К-42	<i>P. esculentus</i>	самка	55,3	23,210	2	
Коряків став	2021	21К-43	<i>P. esculentus</i>	самка	55,5	24,050	2	
Коряків став	2021	21К-44	<i>P. esculentus</i>	самець	55,4	23,860	2	
Коряків став	2021	21К-45	<i>P. esculentus</i>	самець	56,3	22,710	2	
Коряків став	2021	21К-46	<i>P. esculentus</i>	самка	51,2	24,960	2	
Коряків став	2021	21К-47	<i>P. esculentus</i>	самець	62,9	24,320	2	
Коряків став	2021	21К-48	<i>P. esculentus</i>	самець	53,8	24,580	2	
Коряків став	2021	21К-49	<i>P. esculentus</i>	самець	58,0	21,820	2	

Коряків став	2021	21К-50	<i>P. esculentus</i>	самець	57,7	24,520	2	
Коряків став	2021	21К-51	<i>P. esculentus</i>	самець	64,0	31,030	3	
Коряків став	2021	21К-52	<i>P. esculentus</i>	самець	61,1	25,000	2	
Коряків став	2021	21К-53	<i>P. esculentus</i>	самець	63,2	23,790	2	
Коряків став	2021	21К-54	<i>P. esculentus</i>	самець	52,7	22,840	2	
Коряків став	2021	21К-55	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	24,110	2	
Коряків став	2021	21К-56	<i>P. esculentus</i>	самець	52,2	23,180	2	
Коряків став	2021	21К-57	<i>P. esculentus</i>	самець	67,3	25,730	2	
Коряків став	2021	21К-58	<i>P. esculentus</i>	самець	55,8	24,000	2	
Коряків став	2021	21К-59	<i>P. esculentus</i>	самець	67,9	24,700	2	
Коряків став	2021	21К-60	<i>P. esculentus</i>	самець	58,2	24,510	2	
Коряків став	2021	21К-61	<i>P. esculentus</i>	самка	50,0	23,230	2	
Коряків став	2021	21К-62	<i>P. esculentus</i>	самець	58,8	24,640	2	
Коряків став	2021	21К-63	<i>P. esculentus</i>	самець	64,2	25,930	2	
Коряків став	2021	21К-64	<i>P. esculentus</i>	самець	66,8	22,530	2	
Коряків став	2021	21К-65	<i>P. esculentus</i>	самець	69,8	22,570	2	
Коряків став	2021	21К-66	<i>P. esculentus</i>	самець	78,8	23,500	2	
Коряків став	2021	21К-67	<i>P. esculentus</i>	самка	55,0	21,580	2	
Коряків став	2021	21К-68	<i>P. esculentus</i>	самка	48,7	23,250	2	
Коряків став	2021	21К-69	<i>P. esculentus</i>	самка	58,3	26,500	2	
Коряків став	2021	21К-70	<i>P. esculentus</i>	самець	63,7	28,170	2	
Коряків став	2021	21К-71	<i>P. esculentus</i>	самка	60,2	26,070	2	
Коряків став	2021	21К-72	<i>P. esculentus</i>	самець	62,8	28,200	3	
Коряків став	2021	21К-73	<i>P. esculentus</i>	самець	60,2	23,150	2	
Коряків став	2021	21К-74	<i>P. esculentus</i>	самець	71,9	22,170	2	
Коряків став	2021	21К-75	<i>P. esculentus</i>	самка	71,1	23,900	2	
Коряків став	2021	21К-76	<i>P. esculentus</i>	самець	64,6	23,350	2	
Коряків став	2021	21К-77	<i>P. esculentus</i>	самець	72,0	24,110	2	
Коряків став	2021	21К-78	<i>P. esculentus</i>	самка	62,4	27,990	2	
Коряків став	2021	21К-79	<i>P. esculentus</i>	самка	47,7	21,440	2	
Коряків став	2021	21К-80	<i>P. esculentus</i>	самець	47,6	23,810	2	
Коряків став	2021	21К-81	<i>P. esculentus</i>	самець	55,1	24,730	2	

Коряків став	2021	21К-82	<i>P. esculentus</i>	самець	57,8	24,740	2	
Коряків став	2021	21К-83	<i>P. esculentus</i>	самець	65,9	25,910	2	
Коряків став	2021	21К-84	<i>P. esculentus</i>	самець	48,5	24,490	2	
Коряків став	2021	21К-85	<i>P. esculentus</i>	самець	65,5	26,250	2	
Коряків став	2021	21К-86	<i>P. esculentus</i>	самець	49,9	22,410	2	
Коряків став	2021	21К-87	<i>P. esculentus</i>	самець	50,0	23,710	2	
Коряків став	2021	21К-88	<i>P. esculentus</i>	самець	61,5	25,580	2	
Коряків став	2021	21К-89	<i>P. esculentus</i>	самець	59,1	24,600	2	
Коряків став	2021	21К-90	<i>P. esculentus</i>	самець	52,1	28,770	3	
Коряків став	2021	21К-91	<i>P. esculentus</i>	самець	51,4	22,400	2	
Коряків став	2021	21К-92	<i>P. esculentus</i>	самець	61,3	24,090	2	
Коряків став	2021	21К-93	<i>P. esculentus</i>	самець	68,0	24,000	2	
Коряків став	2021	21К-94	<i>P. esculentus</i>	самець	67,8	26,000	2	
Коряків став	2021	21К-95	<i>P. esculentus</i>	самець	51,7	26,850	2	
Коряків став	2021	21К-96	<i>P. esculentus</i>	самець	67,8	25,180	2	
Коряків став	2021	21К-97	<i>P. esculentus</i>	самець	66,1	25,620	2	
Коряків став	2021	21К-98	<i>P. esculentus</i>	самець	61,8	23,770	2	
Коряків став	2021	21К-99	<i>P. esculentus</i>	самець	65,7	25,250	2	
Заплава р. Мож	2019	766	не визначали	самець	32,9	24,400	2	
Заплава р. Мож	2019	767	не визначали	самець	35,4	24,900	2	
Заплава р. Мож	2019	768	не визначали	самець	32,6	23,600	2	
Заплава р. Мож	2019	769	не визначали	самець	41,1	23,900	2	
Заплава р. Мож	2019	770	<i>P. esculentus</i>	самець	32,7	26,700	3	LLR
Заплава р. Мож	2019	771	не визначали	самка	33,3	27,800	2	
Заплава р. Мож	2019	772	не визначали	самець	35,4	23,900	2	
Заплава р. Мож	2019	773	не визначали	самець	37,8	25,900	2	
Заплава р. Мож	2019	774	не визначали	самець	30,9	не визначали	2	
Заплава р. Мож	2019	775	не визначали	самець	32,9	24,800	2	
Заплава р. Мож	2019	776	не визначали	самець	31,6	не визначали	2	
Заплава р. Мож	2019	777	<i>P. esculentus</i>	самець	31,6	25,000	3	LLR
Заплава р. Мож	2019	778	не визначали	самець	31,3	не визначали	2	
Заплава р. Мож	2019	779	не визначали	самець	32,9	не визначали	2	

Заплава р. Мож	2019	780	не визначали	самець	32,6	25,300	2	
Заплава р. Мож	2019	781	<i>P. esculentus</i>	самка	29,3	32,000	3	LLR
Заплава р. Мож	2019	782	не визначали	самець	31,8	25,400	2	
Заплава р. Мож	2019	783	не визначали	самець	31,3	28,500	2	
Заплава р. Мож	2019	784	не визначали	самка	28,9	22,500	2	
Заплава р. Мож	2019	785	не визначали	самець	33,7	23,400	2	
Заплава р. Мож	2019	786	не визначали	самець	30,8	23,400	2	
Заплава р. Мож	2019	787	<i>P. esculentus</i>	самка	32,3	27,900	3	LLR
Заплава р. Мож	2019	788	<i>P. esculentus</i>	самець	30,9	25,300	2	LR
Заплава р. Мож	2019	789	не визначали	самець	34,2	24,000	2	
Заплава р. Мож	2019	790	не визначали	самка	28,9	22,700	2	
Заплава р. Мож	2019	791	не визначали	самка	24,2	21,300	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-22	<i>P. esculentus</i>	самець	71,5	30,900	3	LLR
Заплава р. Мож	2020	20Т-42	<i>P. esculentus</i>	самець	76,7	29,100	3	LLR
Заплава р. Мож	2020	20Т-03	<i>P. esculentus</i>	самець	65,3	27,400	2	LR
Заплава р. Мож	2020	20Т-46	<i>P. esculentus</i>	самець	71,7	26,800	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-04	<i>P. esculentus</i>	самець	68,6	26,600	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-28	<i>P. esculentus</i>	самець	73,1	23,270	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-37	<i>P. esculentus</i>	самець	62,3	23,730	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-36	<i>P. esculentus</i>	самець	72,9	23,770	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-30	<i>P. esculentus</i>	самець	74,4	23,960	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-39	<i>P. esculentus</i>	самець	72,8	24,290	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-40	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	24,330	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-18	<i>P. esculentus</i>	самець	70,5	24,430	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-38	<i>P. esculentus</i>	самець	82,4	24,590	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-14	<i>P. esculentus</i>	самка	84,3	24,680	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-20	<i>P. esculentus</i>	самець	72,6	24,720	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-17	<i>P. esculentus</i>	самець	65,2	24,760	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-33	<i>P. esculentus</i>	самець	74,9	24,810	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-26	<i>P. esculentus</i>	самець	75,5	24,850	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-41	<i>P. esculentus</i>	самець	76,1	24,890	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-08	<i>P. esculentus</i>	самець	74,8	25,010	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-25	<i>P. esculentus</i>	самець	72,7	25,070	2	

Заплава р. Мож	2020	20Т-06	<i>P. esculentus</i>	самець	74,1	25,080	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-32	<i>P. esculentus</i>	самець	72,3	25,110	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-35	<i>P. esculentus</i>	самець	72,2	25,130	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-07	<i>P. esculentus</i>	самець	72,9	25,340	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-19	<i>P. esculentus</i>	самець	68,2	25,450	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-31	<i>P. esculentus</i>	самець	70,4	25,490	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-29	<i>P. esculentus</i>	самець	71,9	25,600	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-44	<i>P. esculentus</i>	самець	64,1	25,780	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-43	<i>P. esculentus</i>	самець	73,5	25,810	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-21	<i>P. esculentus</i>	самець	74,0	25,840	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-34	<i>P. esculentus</i>	самець	77,2	25,900	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-11	<i>P. esculentus</i>	самець	75,0	25,920	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-09	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	26,010	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-45	<i>P. esculentus</i>	самець	68,6	26,010	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-10	<i>P. esculentus</i>	самець	69,3	26,150	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-12	<i>P. esculentus</i>	самець	77,9	26,160	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-23	<i>P. esculentus</i>	самець	72,9	26,240	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-24	<i>P. esculentus</i>	самець	80,6	26,370	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-02	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	26,410	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-01	<i>P. esculentus</i>	самець	78,5	26,450	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-15	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	26,460	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-16	<i>P. esculentus</i>	самець	71,8	26,530	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-05	<i>P. esculentus</i>	самець	75,4	26,610	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-04	<i>P. esculentus</i>	самець	68,8	26,610	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-13	<i>P. esculentus</i>	самець	74,0	26,630	2	
Заплава р. Мож	2020	20Т-27	<i>P. esculentus</i>	самець	70,9	26,680	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-01	<i>P. ridibundus</i>	самка	85,2	21,022	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-02	<i>P. esculentus</i>	самець	65,1	21,432	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-03	<i>P. esculentus</i>	самець	68,9	21,455	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-04	<i>P. ridibundus</i>	самка	83,3	21,604	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-05	<i>P. esculentus</i>	самець	69,2	21,889	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-06	<i>P. esculentus</i>	самець	71,0	22,304	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-07	<i>P. ridibundus</i>	самка	60,1	22,313	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-08	<i>P. esculentus</i>	самець	70,8	22,355	2	

Заплава р. Мож	2021	21Т-09	<i>P. esculentus</i>	самець	71,6	22,377	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-10	<i>P. esculentus</i>	самець	64,3	22,382	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-11	<i>P. esculentus</i>	самець	65,1	22,478	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-12	<i>P. esculentus</i>	самець	64,4	22,517	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-13	<i>P. esculentus</i>	самець	77,7	22,523	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-14	<i>P. esculentus</i>	самець	75,7	22,626	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-15	<i>P. esculentus</i>	самка	89,3	22,702	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-16	<i>P. esculentus</i>	самець	62,6	22,824	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-17	<i>P. esculentus</i>	самець	73,8	22,850	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-18	<i>P. esculentus</i>	самець	77,0	22,859	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-19	<i>P. esculentus</i>	самець	60,5	22,876	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-20	<i>P. esculentus</i>	самець	73,0	22,976	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-21	<i>P. esculentus</i>	самець	70,2	22,991	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-22	<i>P. esculentus</i>	самець	73,1	23,027	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-23	<i>P. esculentus</i>	самець	79,7	23,159	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-24	<i>P. esculentus</i>	самець	67,2	23,209	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-25	<i>P. ridibundus</i>	самка	91,7	23,242	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-26	<i>P. ridibundus</i>	самець	67,1	23,247	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-27	<i>P. esculentus</i>	самець	64,9	23,249	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-28	<i>P. esculentus</i>	самець	67,0	23,365	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-29	<i>P. esculentus</i>	самець	64,7	23,404	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-30	<i>P. esculentus</i>	самець	67,5	23,411	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-31	<i>P. esculentus</i>	самець	77,2	23,427	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-32	<i>P. esculentus</i>	самець	60,4	23,442	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-33	<i>P. esculentus</i>	самець	67,4	23,469	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-34	<i>P. esculentus</i>	самець	78,1	23,619	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-35	<i>P. esculentus</i>	самець	64,0	23,637	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-36	<i>P. esculentus</i>	самець	60,0	23,677	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-37	<i>P. ridibundus</i>	самець	69,1	23,696	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-38	<i>P. esculentus</i>	самець	72,4	23,706	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-39	<i>P. esculentus</i>	самець	72,1	23,708	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-40	<i>P. ridibundus</i>	самка	68,6	23,760	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-41	<i>P. ridibundus</i>	самка	61,3	23,836	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-42	<i>P. esculentus</i>	самець	59,2	23,983	2	

Заплава р. Мож	2021	21Т-43	<i>P. esculentus</i>	самець	69,7	23,989	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-44	<i>P. esculentus</i>	самець	70,0	24,049	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-45	<i>P. esculentus</i>	самець	71,5	24,188	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-46	<i>P. ridibundus</i>	самець	71,0	24,331	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-47	<i>P. esculentus</i>	самець	70,8	24,349	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-48	<i>P. esculentus</i>	самець	70,3	24,369	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-49	<i>P. esculentus</i>	самець	73,3	24,420	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-50	<i>P. esculentus</i>	самець	70,3	24,464	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-51	<i>P. esculentus</i>	самець	64,0	24,499	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-52	<i>P. ridibundus</i>	самка	61,2	24,591	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-53	<i>P. ridibundus</i>	самка	59,1	24,600	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-54	<i>P. esculentus</i>	самець	62,5	24,608	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-55	<i>P. ridibundus</i>	самка	68,7	24,609	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-56	<i>P. esculentus</i>	самець	57,2	24,651	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-57	<i>P. esculentus</i>	самець	62,6	24,823	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-58	<i>P. ridibundus</i>	самка	54,1	25,105	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-59	<i>P. ridibundus</i>	самка	59,5	25,190	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-60	<i>P. ridibundus</i>	самка	62,0	25,641	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-61	<i>P. esculentus</i>	самець	59,3	25,704	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-62	<i>P. esculentus</i>	самець	51,7	26,400	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-63	<i>P. esculentus</i>	самець	62,2	22,980	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-64	не визначали	самець	29,8	20,187	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-65	не визначали	самець	31,9	21,044	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-66	не визначали	самка	34,5	23,783	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-68	не визначали	самка	28,7	17,812	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-70	не визначали	самка	29,5	19,507	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-72	не визначали	самка	31,6	19,731	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-73	не визначали	самка	34,6	20,251	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-74	не визначали	самець	32,4	20,041	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-75	не визначали	самка	28,5	20,226	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-76	не визначали	самець	31,5	20,231	3	
Заплава р. Мож	2021	21Т-80	не визначали	самець	32,5	21,292	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-81	не визначали	самка	31,7	19,872	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-82	не визначали	самець	31,0	21,655	2	

Заплава р. Мож	2021	21Т-83	<i>не визначали</i>	самка	29,5	19,543	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-84	<i>не визначали</i>	самка	30,4	21,616	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-85	<i>не визначали</i>	самець	28,3	20,935	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-86	<i>не визначали</i>	самка	29,9	20,666	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-87	<i>не визначали</i>	самка	31,7	19,946	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-88	<i>не визначали</i>	самка	33,4	22,443	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-90	<i>не визначали</i>	самка	28,3	21,146	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-92	<i>не визначали</i>	самець	31,8	20,955	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-93	<i>не визначали</i>	самець	<i>не визначали</i>	21,972	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-95	<i>не визначали</i>	самка	30,3	21,421	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-96	<i>не визначали</i>	самка	31,7	20,680	2	
Заплава р. Мож	2021	21Т-97	<i>не визначали</i>	самець	<i>не визначали</i>	20,105	2	

Додаткова таблиця 3

Список досліджених гібридних самців *P. esculentus* із різних R-E-ГПС. Вид, плоідність, локалітет, значення промірів довжини тіла, сім'яників, еритроцитів

Локалітет, координати	№ самця	Геном	Довжина тіла, мм	Середня довжина еритроцитів, мкм	Довжина сім'яників, мм		Довжина голівок сперматозоїдів, мкм
					Лівий	Правий	
Нижній Добрицький став, Чугуївський район, Харківська область, Україна; 49.556501, 36.310094	353	LR	67,8	23,1	5,2	4,5	немає даних
	355	LR	72,0	24,3	5,7	5,6	немає даних
	357	LR	70,8	22,9	5,2	4,1	немає даних
	433	LR	74,4	немає даних	8,5	5,9	немає даних
	434	LR	62,9	немає даних	4,5	4,5	немає даних
	435	LR	67,1	немає даних	5,2	5,2	немає даних
	436	LR	64,7	немає даних	5,2	5,2	немає даних
	437	LR	69,6	немає даних	5,4	4,3	немає даних
	438	LR	73,2	немає даних	5,4	4,5	немає даних
	439	LR	72,9	немає даних	4,6	3,6	немає даних
	440	LR	77,8	немає даних	7,4	6,5	немає даних
	654	LR	63,4	немає даних	4,6	4,2	немає даних
	828	LR	73,5	26,5	5,6	5,4	10,6
	829	LR	73,5	26,3	5,7	4,4	12,5
	830	LR	69,0	26,0	3,8	3,6	12,0
	831	LR	71,0	22,3	4,7	4,3	10,6
	832	LR	75,1	24,3	5,6	5,3	11,3
	834	LR	71,6	23,3	5,2	5,1	12,4
	833	LR	73,2	24,4	3,0	3,0	стерильний
	836	LR	74,8	25,3	6,1	3,2	11,9
	837	LR	70,4	25,8	4,6	4,1	8,5
	838	LR	70,7	26,3	5,7	5,3	11,2
	863	LR	74,4	26,2	6,5	6,1	немає даних
865a	LR	60,1	22,3	немає даних	немає даних	немає даних	
826	LRR	73,6	30,2	4,9	4,6	немає даних	
835	LRR	67,4	32,0	4,4	4,1	12,2	
2359	LRR	74,7	30,2	немає даних	немає даних	немає даних	
23110	LRR	56,9	25,9	немає даних	немає даних	немає даних	
2302	LLR	73,6	25,2	немає даних	немає даних	немає даних	
2317	LLR?	66,7	29,6	немає даних	немає даних	немає даних	
Коряків став, Чугуївський район, Харківська область,	585	LR	немає даних	немає даних	6,4	4,7	немає даних
	688	LR	65,3	26,7	2,8	2,3	немає даних

Україна; 49.615759; 36.312244	690	LR	78,0	28,0	5,1	4,7	немає даних
	867	LR	62,3	26,7	3,4	2,9	немає даних
	868	LR	63,7	24,0	4,7	3,9	немає даних
	824	LLR	63,7	28,1	3,9	3,2	немає даних
	866a	LLR	62,8	26,9	немає даних	немає даних	немає даних
Заплава р. Мож, с. Тимченки, Чугуївський район, Харківська область, Україна; 49.749167; 36.162778	18T-8	LR	47,9	немає даних	4,6	5,9	немає даних
	17T-5	LR	52,4	немає даних	2,1	5,8	немає даних
	17T-8	LR	54,8	немає даних	4,5	5,0	немає даних
	17T-10	LR	54,1	немає даних	3,9	4,5	немає даних
	18T-6	LR	53,8	немає даних	3,9	8,3	немає даних
	18T-7	LR	53,3	немає даних	4,5	6,0	немає даних
	822	LR	65,3	27,4	4,3	4,2	немає даних
	823	LR	71,7	26,8	5,0	4,5	немає даних
Іськів став, Чугуївський район, Харківська область, Україна; 49.627778; 36.282778	18I-90	LR	49,5	немає даних	4,1	3,9	немає даних
	18I-91	LR	55,8	немає даних	7,8	4,8	немає даних
	19I-61	LR	60,2	немає даних	6,2	4,3	немає даних
	19I-60	LR	68,5	немає даних	4,0	4,0	немає даних
	19I-62	LR	55,5	немає даних	3,3	3,3	немає даних
	856	LR	62,6	26,9	3,7	3,2	немає даних
	857	LR	63,4	25,9	4,0	3,7	немає даних
р. Уди, м. Харків, Україна, 49.968333; 36.136944	17U-4	LR	43,8	немає даних	3,4	3,4	немає даних

		Мейоз I	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Мейоз II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Анеуплоїдні	L	Мітози	1	3	2	0	10	5	0	4	2	7	0	14
		Мейоз I	0	4	2	0	3	3	0	0	0	0	1	0
		Мейоз II	0	0	1	0	3	7	1	12	0	0	0	3
	R	Мітози	3	4	29	6	4	1	5	1	6	1	10	30
		Мейоз I	36**	8	17	19	3	0	5	0	2	12	6	14
		Мейоз II		2	2	5	2	0	43	10	28	0	4	1

Додаткова таблиця 5

Кількість проаналізованих мейотичних метафаз і сперматид *P. ridibundus* (FISH-мічення перичентромерного повтору RrS1) і *P. lessonae* (FISH-мічення перичентромерного повтору Ples289) у сім'яниках 40 гібридів. Метафази мейозу I з хромосомами *P. lessonae* (13 бівалентів з чотирма сигналами Ples289) та II (13 унівалентів з двома сигналами Ples289); метафази мейозу I з хромосомами *P. ridibundus* (13 бівалентів) та II (13 унівалентів) з сигналами RrS1, сигнали Ples289 відсутні; кон'юговані хромосоми *P. ridibundus* і *P. lessonae* у мейозі I (13 бівалентів з двома сигналами Ples289) та II (13 унівалентів з одним сигналом Ples289). Анеуплоїдні мейотичні метафази – кількість хромосом не кратна 13 бівалентам або унівалентам. Сперматиди з геномом *P. lessonae*: два сигнали – гаплоїдні сперматиди, чотири сигнали – диплоїдні сперматиди, один, три, більше чотирьох сигналів – анеуплоїдні сперматиди; гаплоїдні сперматиди з геномом *P. ridibundus* (сигнали RrS1, сигнали Ples289 відсутні).

Локалітет	Геном	№ самця	Кількість мейотичних метафаз з геномом											СУМ-МА	Кількість сперматид із сигналом					Геном у клітинах				
			<i>P. lessonae</i> (Ples289 сигнали)				<i>P. ridibundus</i> (RrS1 сигнали, немає сигналів Ples289)					Кон'югація між хромосомами <i>P. lessonae</i> та <i>P. ridibundus</i> (RrS1, Ples289 сигнали)				RrS1, без Ples289	Ples289 (n=2)	Ples289 (n=4)	Ples289 (n>4)		Ples289 (n=1; 3)	СУММА		
			13 бівалентів	13 унівалентів	26 унівалентів	Анеуплоїдні	13 бівалентів	13 унівалентів	26 бівалентів	26 унівалентів	Анеуплоїдні	13 бівалентів	13 унівалентів		26 унівалентів								Анеуплоїдні	
Нижній	LR	831	12	22	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	L

Коряків став	LLR	866a	110	1	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	121	0	280	6	1	47	334	L
Коряків став	LLR	824	4	0	6	2	0	0	0	0	0	18	0	26	30	86	12	18	3	0	12	45	L L+R кон'юг.
Іськів став	LR	857	10	11	0	15	3	1	0	0	3	0	0	0	0	43	115	14	0	0	0	129	L R
Іськів став	LR	856	9	36	5	25	9	9	0	1	4	0	0	0	0	98	133	101	1	0	4	239	L R
р. Мож	LR	823	9	21	9	71	0	6	0	2	5	0	0	0	0	123	25	15	1	0	20	61	L R
р. Мож	LR	822	0	0	0	0	16	11	0	1	4	0	0	0	0	32	193	0	0	0	0	193	R

Додаткова таблиця б

Відсоток хромосом, забарвлених у різні кольори, які відповідають різним геномам в десяти обраних рандомним чином мейотичних метафазах з сім'яників гібридних самців *Pelophylax* з R-E-ГПС Корякова ставу. Рожевий - хромосоми (біваленти або уніваленти) *P. lessonae*; зелений - хромосоми (біваленти або уніваленти) *P. ridibundus*; синій - хромосоми (біваленти або уніваленти) з невідомим геномом; синій+зелений, зелений+червоний, червоний+синій, синій+зелений+червоний - хромосоми (біваленти або уніваленти) з різною комбінацією геномів (*P. lessonae*, *P. ridibundus* та невідомим геномом)

№ самця	№ пластинки	Геном, колір зафарбовування / Тип хромосом	Кількість зафарбованих хромосом після CGH						Загальна кількість хромосом різного типу	
			L (Червоний)	R (Зелений)	Невідомий (Синій)	L+R+? (Червоний, зелений, синій)	L+R (Червоний, зелений)	R+? (Зелений, синій)		L+? (Червоний, синій)
824	1	Біваленти	0	0	0	0	3	0	1	4
		Уніваленти	3	5	1	0	9	6	2	26
		Загальна кількість хромосом	3	5	1	0	15	6	4	34
		% хромосом із геномом	9%	15%	3%	0%	44%	18%	12%	
	2	Біваленти	0	0	0	0	1	4	0	5
		Уніваленти	0	4	4	8	0	8	3	27
		Загальна кількість хромосом	0	4	4	8	2	16	3	37
		% хромосом із геномом	0%	11%	11%	22%	5%	43%	8%	
	3	Біваленти	0	0	0	1	2	3	0	6
		Уніваленти	0	5	3	3	3	2	6	22
		Загальна кількість хромосом	0	5	3	5	7	8	6	34
		% хромосом із геномом	0%	15%	9%	15%	21%	24%	18%	
	4	Біваленти	0	1	0	3	0	0	0	4
		Уніваленти	0	3	2	18	1	3	0	27
		Загальна кількість хромосом	0	5	2	24	1	3	0	35

	Загальна кількість хромосом	0	4	2	26	0	0	0	32
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>13%</i>	<i>6%</i>	<i>81%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	
6	Біваленти	0	1	0	23	0	0	8	32
	Уніваленти	0	0	0	2	0	0	0	2
	Загальна кількість хромосом	0	2	0	48	0	0	16	66
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>3%</i>	<i>0%</i>	<i>73%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>24%</i>	
7	Біваленти	0	2	1	15	0	5	0	23
	Уніваленти	0	0	0	0	0	0	0	0
	Загальна кількість хромосом	0	4	2	30	0	10	0	46
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>9%</i>	<i>4%</i>	<i>65%</i>	<i>0%</i>	<i>22%</i>	<i>0%</i>	
8	Біваленти	0	0	0	9	0	10	0	19
	Уніваленти	0	0	0	0	0	0	0	0
	Загальна кількість хромосом	0	0	0	18	0	20	0	38
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>47%</i>	<i>0%</i>	<i>53%</i>	<i>0%</i>	
9	Біваленти	0	0	0	18	0	6	0	24
	Уніваленти	0	0	0	0	0	0	0	0
	Загальна кількість хромосом	0	0	0	36	0	12	0	48
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>75%</i>	<i>0%</i>	<i>25%</i>	<i>0%</i>	
10	Біваленти	0	0	0	23	0	0	0	23
	Уніваленти	0	0	0	2	0	0	0	2
	Загальна кількість хромосом	0	0	0	48	0	0	0	48
	<i>% хромосом із геномом</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>100%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	<i>0%</i>	

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:58:48 05.12.2023

Назва файлу з підписом: Diss_Pustovalova.pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 5.6 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Diss_Pustovalova.pdf

Розмір файлу без підпису: 5.6 МБ

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

Підписувач: Пустовалова Елеонора Сергіївна

П.І.Б.: Пустовалова Елеонора Сергіївна

Країна: Україна

РНОКПП: 3501704865

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 14:57:36 05.12.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF97040000009FB911005E818801

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

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

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

Сертифікат: Кваліфікований