

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

ДРОГВАЛЕНКО МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК: 597.8:591.9(477:574):591.3

ДИСЕРТАЦІЯ


**РІЗНОМАНІТТЯ СКЛАДУ ГЕМІКЛОНАЛЬНИХ ПОПУЛЯЦІЙНИХ
СИСТЕМ *PELOPHYLAX ESCULENTUS* COMPLEX В УКРАЇНІ
ТА ЧИННИКИ, ЩО ПІДТРИМУЮТЬ ЇХНЮ СТІЙКІСТЬ**

Спеціальність 091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

 Дрогваленко М.О.

Науковий керівник Шабанов Дмитро Андрійович, доктор біологічних наук,
професор кафедри зоології та екології тварин

Харків - 2023

АНОТАЦІЯ

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

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

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

Робота була здійснена з використанням матеріалу, що включав в себе колекції та базу даних лабораторії Популяційної екології амфібій (ХНУ імені В.Н. Каразіна, кафедра Зоології та Екології тварин) та Музею Природи ХНУ імені В.Н. Каразіна, дані з персонально проведених експедиційних досліджень, а також матеріалу, отриманого шляхом експериментальних лабораторних схрещувань зелених жаб, відловлених у природніх ГПС. Морфологічна частина дослідження включала в себе видову та статеву

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

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

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

Встановлено, що розповсюдження ГПС, що містять в своєму складі триплоїдів, може бути ширшим, ніж передбачалося. Нові потенційні

локалітети поширення триплоїдних *P. esculentus* включають в себе ГПС Чорнобильської Зони, Пониззя Дніпра (Гола Пристань) та північні притоки української течії Сіверського Донця (для яких раніше триплоїди не фіксувалися).

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

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

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

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

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

Онтогенетичні показники різних ГПС (довжина еритроцитів і довжина тіла у різних видів та гібридів різної плоїдності) продемонстрували значну

мінливість між системами, причому і на рівні дорослих тварин, і на рівні ювенілів. Для ювенільних особин показник довжини еритроцитів слід застосовувати особливо обережно. Показано, що для пуголовків та цьогорічок цей показник має потенціал для застосування, межі якого ще слід вивчити.

Описаний зв'язок різноманіття геномів, характеру гаметогенезу та добору серед у ГПС Іськова ставка. Висока клональність L-геномів тут поєднується з високим різноманіттям R-геномів, що свідчить про значну роль рекомбінації, яка перебігає тут, вочевидь, у нечисленних *P. ridibundus* і, гіпотетично, LRR-*P. esculentus*. Суттєва (або повна) елімінація припускається для потомства обох батьківських генотипів, частини диплоїдних та триплоїдних гібридів.

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

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

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

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

Наукова новизна роботи полягає у вивченні складу ГПС нових локалітетів України, до цього не охоплених спеціальними дослідженнями геміклональних популяційних систем, включаючи природоохоронні території. Показане ширше, ніж вважалося до того, поширення триплоїдних *P. esculentus* в Україні. Вперше досліджено склад, генетичне різноманіття і динаміку унікальних R-Erf ГПС нижньої течії українського Сіверського Донця. Вперше підсумована багаторічна динаміка складу, морфологічних і цитологічних показників у кількох ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Досліджено характер розмноження, добору і різноманіття геномів у ряді модельних ГПС. Виявлено морфологічні відмінності раннього розвитку різних форм *P. esculentus* complex; також виявлені їхні морфологічні та фенологічні аномалії розвитку і розмноження. Розроблено і випробувано нову методику прижиттєвого схрещування жаб.

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

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

ANNOTATION

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

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

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

The work was conducted using material from the collection and database of Amphibian population ecology laboratory (KhNU, Zoology and Animal Ecology department) and KhNU Natural Museum, from the personally conducted expeditions, from the experimental laboratory crossings of water frogs collected in natural HPS. Morphological work consisted of species and sex identification by external (body coloration and proportions) and internal (gonadal morphology) traits in the field and/or laboratory conditions, and measuring of the body size. Cytological study included the preparation of blood slides and measuring of erythrocyte long-

axis lengths as a preliminary estimator of ploidy (and, later, of ontogenetic features); karyological study included the direct estimation of ploidy in studied animals via preparation of metaphase chromosomes slides and karyotype counting (chromosomes of nucleoli); further method development included the Giemsa or DAPI staining, or FISH application for precise genotyping. Molecular method included the microsatellite analysis of species-specific and cross-specific loci and/or analysis of species-specific SNPs in *uqcrfs1* gene sequence. Statistical analysis of obtained results was conducted using R with ggplot2, tidyverse, outliers, reshape, gridExtra, ggforce, dunn.test, extraoperators, and corrplot packages.

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

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

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

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

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

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

It was shown that in the set of population systems the spectrum of developmental anomalies (disturbances) exists, which probably have genetic background and thus probably serve as one of those ontogenetic mechanisms maintaining the stable existence of HPS through generations. As such anomalies we can consider the developmental retardment (avoiding metamorphosis) or early developmental disturbances (morphological malformations) among the tadpoles of certain genetic forms, heterochrony observed in Iskiv pond hybrids, or even malformations remaining till the juvenile age (limb malformations).

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

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

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

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

For the first time the composition was described in detail and the reproduction scheme was suggested for unique R-Epf HPS near Kreminna city and Brusivka village. Triploid *P. esculentus* females with genotype LLR (as the only hybrid form) co-exist here with *P. ridibundus* of both sexes; the marsh frog males are used by LLR-females for self-reproduction. In their progeny, LR-hybrids of both sexes and LLR-males are eliminated – and *P. ridibundus* are absent. It is suggested that LLR-females either produce the mixture of L- and LL-gametes or L-genomes duplicate in some eggs after fertilization.

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

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

The scientific novelty of the work consists of studying of HPS composition in new localities in Ukraine, not having covered by special research on hemiclonal population systems before, including the protected areas. The wider than expected distribution of triploid *P. esculentus* in Ukraine was shown. For the first time, the composition, genetic diversity and dynamics of the unique R-Epf HPS in lower Siverskyi Donets stretches was studied. For the first time, the long-term dynamics of composition and morphological and cytological estimators of a few HPS from Siverskyi Donets diversity center of water frogs diversity was summarized. The

reproduction, selection and genomes diversity was studied for the set of model HPS. The morphological differences of early development were found for different *P. esculentus* forms; also, their morphological and phenological anomalies of reproduction and development was found. A new intravital technique for artificial crossing of frogs was developed and tested.

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

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

Список публікацій здобувача за темою дисертації

У зарубіжних наукових виданнях, що входять до наукометричних баз Scopus або Web of Science:

- Drohvalenko M., Fedorova A. The First Evidence of Triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone. Bonn Zoological Bulletin. 2022. Vol. 71, no. 2. P. 105-108. <https://doi.org/10.20363/BZB-2022.71.2.105>
- Fedorova Anna, Pustovalova Eleonora, Drohvalenko Mykola. High Frequency of Hindlimb Malformation in Froglets *Pelophylax sp.* in Ukraine. The Herpetological Bulletin. 2023. Vol. 164. P. 24-25. <https://doi.org/10.33256/hb164.2425>

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

- Drohvalenko M., Pustovalova E., Fedorova A. First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh River basin (Kharkiv region, Ukraine). Biodiversity, ecology and experimental biology. 2021. Vol. 23, no. 2. P. 61-67. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>
- Drohvalenko, M. O. Tadpole Morphology Features of Different *Pelophylax esculentus* complex Forms. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. 2021. Vol. 37. P. 51-64. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-4>

Праці, що додатково відображають результати дисертації:

- Drohvalenko M. Extended Breeding of the Marsh Frog, *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771). Reptiles & Amphibians. 2021. Vol. 28, no. 1. P. 37-39. <https://doi.org/10.17161/randa.v28i1.15301>
- Drohvalenko Mykola, Fedorova Anna, Pustovalova Eleonora. Unexpected Heterochrony in Edible Frog (*Pelophylax esculentus* Linnaeus 1758) and Pallas' Spadefoot (*Pelobates vespertinus* Pallas 1771) in Eastern Ukraine.

Reptiles & Amphibians. 2022. Vol. 29, no. 1. P. 472-474.

<https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>

Список публікацій здобувача, що засвідчують апробацію результатів дисертації

- Biliaiev, I., H. Bondarenko, D. Harbuz, **M. Drohvalenko**, Y. Siervatovska, U. Sudarenko, U. Teplenko, A. Fedorova, D. Shabanov. Composition and changes of three hemiclinal population systems of water frogs from NNP ‘Gomilshanski lisy’. Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій». 2018. С. 18-21. Шацьк: Львів : СПОЛОМ.
- **Drohvalenko, M.O.**, A.O. Fedorova, E.S. Pustovalova, P. Mikulíček. Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclinal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex. Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.) 2023. (in print)
- Fedorova, A.O., **M.O. Drohvalenko**, і E.S. Pustovalova. Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond. Kiev, Institute of zoology: Zoological courier. 2018. Т. 12. С. 22-23. <http://izan.kiev.ua/rmd/KMDZ18-abstr.pdf>.
- Pustovalova, E., A. Fedorova, M. Drohvalenko. Exploring *Pelophylax esculentus* systems: first records of triploids in the Mozh river basin. Матеріали всеукраїнської наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій». 2021. С. 13-16. Львів, Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
- Shabanov, V., A. Kryvoltsevych, A. Zhadan, O. Podpryatov, A. Fedorova, **M. Drohvalenko**, E. Pustovalova. Monitoring of the State of HPS of Water Frogs Located in Lower Dobrytskyi Pond. Матеріали Всеукраїнської Наукової

- Конференції «Стан і Біорізноманіття Екосистем Шацького Національного Природного Парку Та Інших Природоохоронних Територій». 2021. С. 16-18. Львів, Шацьк: СПОЛОМ, Львів.
- Zahoruiko, Ye., M. Solohub-Yosef, T. Hostkina, A. Fedorova, **M. Drohvalenko**, E. Pustovalova. Water Frogs from Koriakiv Pond: Annual Monitoring of Hemiclinal Population System. Матеріали Всеукраїнської Наукової Конференції «Стан і Біорізноманіття Екосистем Шацького Національного Природного Парку Та Інших Природоохоронних Територій». 2021. С. 24-26. Львів, Шацьк: СПОЛОМ, Львів.
 - Дрогваленко Микола, Федорова Анна. Дослідження геміклональних популяційних систем зелених жаб зони відчуження. Літопис природи. Київ: Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник. 2022. Т. 5. С. 191-194.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ANNOTATION.....	7
ЗМІСТ	15
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. ГІБРИДОГЕННИЙ PELOPHYLAХ ESCULENTUS COMPLEX.....	23
1.2. ГПС PELOPHYLAХ ESCULENTUS COMPLEX	28
1.3. Вивченість PELOPHYLAХ ESCULENTUS COMPLEX В УКРАЇНІ.....	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	36
2.1. ТЕРИТОРІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	36
2.2. ПОЛЬОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ	39
2.3. УТРИМАННЯ ТВАРИН.....	40
2.3.1. Утримання дорослих жаб.....	40
2.3.2. Утримання пуголоків і метаморфів.....	41
2.4. МОРФОЛОГІЧНІ МЕТОДИ.....	42
2.4.1. Розміри тіла.....	42
2.4.2. Видова ідентифікація.....	43
2.4.3. Статева ідентифікація	45
2.5. ЦИТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ.....	46
2.5.1. Вимірювання довжини еритроцитів.....	46
2.5.2. Каріологія метафазних пластинок.....	48
2.5.3. FISH та DAPI-зabarвлення	50
2.6. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ	51
2.6.1. Зразки та виділення ДНК.....	52
2.6.2. Мікросателітний аналіз.....	52

2.6.3.	Аналіз SNP у послідовностях	54
2.7.	СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ	55
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ГПС ЗЕЛЕНИХ ЖАБ В УКРАЇНІ		57
3.1.	ЗАХІДНА УКРАЇНА	57
3.1.1.	Львівщина	57
3.1.2.	Чернівці	58
3.2.	РІЧКА ДНІПРО	60
3.2.1.	Острів Хортиця	60
3.2.2.	Пониззя Дніпра	60
3.3.	ЛІВОБЕРЕЖНІ ПРИТОКИ ДНІПРА	62
3.3.1.	НПП «Пирятинський»	62
3.3.2.	РЛП «Сеймський»	65
3.3.3.	Вакалівщина	67
3.3.4.	НПП «Слобожанський»	69
3.4.	ЧОРНОБИЛЬСЬКА ЗОНА ВІДЧУЖЕННЯ	70
3.5.	ХАРКІВЩИНА	78
3.5.2.	Сіверський Донець	78
3.5.3.	Ріка Харків	79
3.5.4.	Ріка Лопань	80
3.5.5.	Ріка Уди	82
3.5.6.	Басейн ріки Мож	83
3.5.7.	Річка Оскол	86
3.6.	ДИНАМІКА СКЛАДУ П'ЯТИ ГПС БАСЕЙНУ СІВЕРСЬКОГО ДОНЦЯ ...	87
Висновки Розділу 3		96
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОНТОГЕНЕЗУ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ		98
4.1.	НОРМАЛЬНИЙ РОЗВИТОК	98
4.2.	ПРИЖИТТЄВА МЕТОДИКА ШТУЧНОГО СХРЕЩУВАННЯ	101
4.3.	ПОРІВНЯННЯ МОРФОЛОГІЇ ПУГОЛОВКІВ РІЗНИХ ФОРМ	104
4.4.	АНОМАЛІЇ РОЗВИТКУ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ	114

4.4.1. Гетерохронія метаморфів з ГПС Іськова ставка.....	114
4.4.2. Вади розвитку цьогорічок з ГПС Добрицького ставка.....	118
4.4.3. Аномалії розвитку у ГПС Кремінної та Брусівки.....	121
4.5. ФЕНОЛОГІЧНІ АНОМАЛІЇ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ.....	123
4.6. РОЗМІРИ ТІЛА ТА ЕРИТРОЦИТІВ ЯК МАРКЕР ОНТОГЕНЕЗУ.....	128
4.6.1. Розміри тіла і еритроцитів у дорослих жаб.....	128
4.6.2. Розміри еритроцитів у пуголовків та цьогорічок.....	132
Висновки Розділу 4.....	137
РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ДОБОРУ В ГПС БАСЕЙНУ СІВЕРСЬКОГО ДІНЦЯ	139
5.1. ОСОБЛИВОСТІ ДОБОРУ В ГПС ІСЬКОВА СТАВКА.....	139
5.1.1. Аналіз природньої популяційної системи.....	139
5.1.2. Аналізуюче схрещування.....	145
5.2. ХАРАКТЕР ДОБОРУ В ГПС КОРЯКОВА СТАВКА	148
5.3. ВІДТВОРЕННЯ В ГПС КРЕМІННОЇ І БРУСІВКИ	154
5.4. ХАРАКТЕР ДОБОРУ В ГПС ЖУРАВЛІВСЬКОГО ГІДРОПАРКУ.....	170
5.5. ХАРАКТЕР ДОБОРУ В ГПС С. ТИМЧЕНКИ	173
Висновки Розділу 5.....	176
ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	178
ВИСНОВКИ.....	180
ПОДЯКИ	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	185
ДОДАТОК А: СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА	185

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГПС	Геміклональна популяційна система, спосіб існування різних генетичних форм <i>Pelophylax esculentus</i> , разом з батьківськими видами або без них
L/(L)- та R/(R)-геноми	Геноми <i>P. lessonae</i> та <i>P. ridibundus</i> ; дужки позначають клональність генома
LR, LLR, LLR	Генотипи диплоїдних та двох форм триплоїдних <i>P. esculentus</i>
L-E, R-E, L-E-R, E тип	Тип ГПС за присутністю в її складі <i>P. lessonae</i> (L), <i>P. ridibundus</i> (R), <i>P. esculentus</i> (E)
-Er, -Erf, -Erm	Присутність триплоїдних <i>P. esculentus</i> в ГПС: обох статей (p) чи лише самців або самиць (pf, pm)
L ^Y , R ^Y	Геноми, що несуть фактор визначення чоловічої статі

ВСТУП

Актуальність теми. Геміклональні популяційні системи (ГПС) як особлива форма існування міжвидових гібридогенних комплексів привертають дедалі більшу увагу дослідників. Популяційні, онтогенетичні, цитологічні та молекулярні процеси, що відбуваються в цих системах (зокрема у організмах гібридних форм) та задають динаміку кожної з них, досі лише починають достеменно досліджуватися.

Вже давно відомо, що розповсюдження різних типів ГПС *P. esculentus* complex має свою певну географічну закономірність, пов'язану і з розповсюдженням батьківських форм, і з екологічними пристосуваннями гібридів, і з еволюційною історією окремих систем в різних частинах ареалу *P. esculentus*. Відчутна частина ареалу обох батьківських видів включає Україну – країну, для якої поширеність представників цього комплексу вивчена слабо, а поширеність та склад ГПС на всій території – вкрай слабо. Цей факт тим більше потребує втручання, що саме на території сходу України (басейн Сіверського Донця) був описаний і порівняно детально досліджений регіон високого різноманіття ГПС, саме на прикладі якого були вивчені ряд ключових процесів життєдіяльності і розмноження гібридних форм.

Незвичайність складу окремих ГПС додатково доповнюється усвідомленням складності і взаємодії механізмів стійкості, що підтримують стає існування таких ГПС. Деякі з них відомі: це, селективна смертність, порушення фертильності та порушення розвитку певних форм; їхня комплексна дія мало зрозуміла досі. Всі вони очевидно мають реалізуватися в ході онтогенезу окремих особин, вірогідно, характерним для різних ГПС чином.

Дана робота покликана збагатити існуючі дані щодо розповсюдження геміклональних популяційних систем зелених жаб в Україні, паралельно дослідивши молекулярні та онтогенетичні процеси в найскладніших з них.

Об'єкт досліджень. Об'єктом дисертаційного дослідження є геміклональні популяційні системи гібридогенного комплексу зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex на території України.

Предмет досліджень. Предметом дисертаційного дослідження є склад геміклональних популяційних систем зелених жаб та популяційні процеси в таких системах.

Мета і завдання роботи. Метою дисертаційного дослідження є вивчення різноманіття складу геміклональних популяційних систем зелених жаб в Україні та його зв'язку з онтогенезом зелених жаб і добором у таких системах.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені наступні **дослідницькі завдання**:

1. вивчити склад різних геміклональних популяційних систем *Pelophylax esculentus* complex в Україні;
2. дослідити особливості онтогенезу представників *Pelophylax esculentus* complex;
3. дослідити характер розмноження і добору в геміклональних популяційних системах басейну Сіверського Дінця.

Методи дослідження. Польові методи збору і реєстрації амфібій, польові методики методи мічення-повторного відлову, морфометрія, гістологічні методи (мікроскопічна цитометрія еритроцитів, каріологічний аналіз мітотичних пластинок, FISH), методики прижиттєвого схрещування, аналіз ДНК (мікросателітний аналіз включно з гель-електрофорезом, аналіз видоспецифічних SNP), статистичні методи.

Наукова новизна результатів. Зареєстровано нові локалітети розповсюдження ГПС *P. esculentus* complex в Україні та описано їхній склад. Зареєстровано нові локалітети проживання триплоїдних гібридів в Україні.

Уточнено поширення окремих підтипів ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Підсумовано багаторічну динаміку окремих ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Грунтуючись на існуючих методах, розроблено і успішно впроваджено оригінальний метод прижиттєвого штучного схрещування зелених жаб. Виявлено аномалії та відмінності розвитку у різних генетичних форм *P. esculentus* complex в різних ГПС. Вперше детально описано склад, особливості розмноження та добору в унікальних R-Epf ГПС. На основі молекулярних даних запропоновано моделі добору для кількох R-E та R-E-Ep ГПС.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням здобувача. Здобувачем проведено аналіз літературних джерел за темою. Автором самостійно зібрано суттєву частину проаналізованого польового матеріалу, у тому числі в ході експедиційних виїздів. Окрім цього, автор брав безпосередню участь у первинному зборі метричних даних, відборі і фіксуванні зразків тканин та отриманні даних мікроскопічної цитометрії. Здобувач самостійно виконав частину лабораторної роботи з генотипування і проаналізував отримані ним молекулярні дані. Також, автор брав безпосередню участь у переважній частині експериментальних робіт по штучному схрещуванню жаб та вирощуванню потомства. Весь включений в роботу статистичний аналіз виконаний автором особисто.

Апробація матеріалів дисертації. Зміст дисертації був висвітлений в тому числі у тезах доповідей на таких конференціях: «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, Чернівецька область; 12-13 жовтня 2023 р.); «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій» (сmt Шацьк; 2018 р. та кілька у 2021 р.); «Конференція молодих дослідників-зоологів» (Київ, Інститут зоології; 2018 р., 2022 р.); «Фауна України на межі ХХ-ХХІ ст. Стан і біорізноманіття екосистем природоохоронних територій» (м. Львів-сmt Шацьк; 12–15 вересня 2019 р.); а також в рамках усної доповіді

на «XI Міжнародній конференції українського герпетологічного товариства» (Київ-Чернігів; 14-17 вересня 2021 р.); та увійшов до Тому 5 Літопису природи Чорнобильського радіаційно-екологічного біосферного заповіднику (Київ, 2022 р.).

Публікації. За темою дисертації вийшли друком 4 публікації в закордонних журналах, проіндексованих у базах даних Scopus, WoS або інших; 2 публікації у виданнях, що на момент публікації входять до переліку наукових фахових видань України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 235 сторінках, складається з анотації, змісту, основної частини, списку використаних джерел (325 посилань) та додатку А (список публікацій здобувача). Основна частина складається з наступних розділів: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, 3 розділи результатів та обговорення, перспективи подальших досліджень, висновки, – та викладена на 164 сторінках. Текст дисертації містить 60 ілюстрацій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота була підтримана грантом Ягеллонського університету в Кракові (Universytet Jagiellonski w Krakowie) за підтримки Польського агентства фінансування науки (NCN, Narodowe Centrum Nauki) по договору № УМО-2022/01/4/NZ8/00020 (від 11 квітня 2023 р./11 kwietnia 2023 r.).

Практичне значення отриманих результатів. Матеріал, зібраний впродовж дисертаційного дослідження, поповнив герпетологічну колекцію Музею Природи ХНУ імені В.Н. Каразіна. Точки знахідок видів досліджуваного комплексу внесені до загальнодоступної міжнародної бази даних ресурсу GBIF. Результати місцевих досліджень уточнили фауністичні списки природоохоронних територій та були включені до Літописів природи природоохоронних об'єктів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гібридогенний *Pelophylax esculentus* complex

Зелені жаби належать до роду *Pelophylax* Fitzinger, 1843 (колишнім підродом роду *Rana* Linnaeus, 1758; Duellman i Schlager 2003) та є одними з найпоширеніших представників європейських амфібій (Plötner et al. 2010). До складу всіх відомих гібридогенних комплексів зелених жаб історично входить той самий батьківський вид: озерна жаба *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) – диплоїдний генотип цього виду надалі буде позначатися «RR» (за першими літерами видової назви). Другими батьківськими видами для гібридів стали ставкова жаба *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), чий генотип аналогічно позначають LL, іберійська жаба *Pelophylax perezi* (López-Seoane, 1885) та італійська ставкова жаба *Pelophylax bergeri* (Günther, in Engelmann, Fritzsche, Günther & Obst, 1986), який інколи визнається як підвид *P. lessonae bergeri*. Відповідні гібридні форми носять назви їстівної жаби *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), *Pelophylax grafi* (Crochet, Dubois, Ohler & Tunner, 1995) та *Pelophylax hispanicus* (Bonaparte, 1839) (Dufresnes i Mazepa 2020).

Останні дві гібридні форми мають невеликий ареал, порівняно рідкісні та мають неясне походження (наприклад, Pagano, Lode, i Crochet 2001) – на відміну від *P. esculentus*, який є найбільш вивченою формою серед них (Plotner 2005; Leszek Berger 2008). Всі ці гібридні форми мають назву, аналогічну видовій, хоча це й не прийнято для гібридів. Однак, природа цих гібридів не дозволяє ставити їх в один ряд з більшістю інших (Шабанов 2015). Геміклональний спосіб розмноження цих гібридів робить їх окремою еволюційною одиницею, здатною відтворювати себе саму у взаємодії з батьківськими видами. Поява гібридів першого покоління відома – за симпатричного існування популяцій обох видів, – але достатньо рідкісна (Leszek Berger 1968; Polls Pelaz 1994). Найперший представник зелених жаб,

описаний Карлом Ліннеєм, був саме гібридною особиною, а саме їстівною жабою. Такі гібриди володіють проміжними морфологічними та поведінковими ознаками, екологічними преференціями та інколи існують без батьківських видів – і саме тому часто розглядаються як окремі таксони (Dufresnes і Mazera 2020). Інший варіант наукової назви, з додаванням інтеркалярної частинки kl. («klepton»), не привносить нової інформації, якщо мова йде лише про один комплекс видів.

Міжвидова гібридизація часто веде до зниженої фертильності чи стерильності міжвидових гібридів, зумовлених проблемами з гаметогенезом – а саме неможливістю клітин зародкової лінії здійснити нормальний мейоз внаслідок несумісності гомологічних хромосом, що належать геномам різних видів. Одним з рішень для гібридів могло б стати «винайдення» сумісних гомологів для хромосом з кожного геному – тобто, поліплоїдизація з наступним звичайним статевим розмноженням (Dufresne et al. 2014). Інший шлях – повна клональність, наприклад, за рахунок партеногенезу без рекомбінації (Schön, Martens, і Dijk 2009). Це два кардинально відмінні шляхи, бо перший дозволяє рекомбінації підтримувати різноманіття геномів батьківських видів, тоді як другий призводить до «застигання» різноманіття обох геномів, бо кожен нащадок ідентичний материнському організму. Геміклональний спосіб розмноження як явище (Stöck et al. 2021) в певному сенсі комбінує ознаки цих двох способів, хоча й робить гібридні організми залежними від поставників рекомбінантних геномів (Avisé 2015).

Геміклональний спосіб розмноження був описаний, а потому і найкраще вивчений для гібридогенного комплексу *Pelophylax esculentus* complex (H.G. Tunner 1973; Heinz G. Tunner 1974). Гібридна природа і геміклональна спадковість їстівних жаб була вперше описана і експериментально підтверджена польським дослідником Лешеком Бергером, якому належить і маса інших піонерних і підсумкових досліджень в цій галузі (Leszek Berger 1968; 1973; Gunther, Uzzell, і Berger 1979; L. Berger, Uzzell, і Hotz 1982; L.

Berger 1983; Leszek Berger 1988; 2008). Пізніші дослідження продемонстрували, що ця гібридна форма може існувати не лише у вигляді диплоїдних особин з генотипом LR, що мають по одному геному двох батьківських видів (див. вище). Серед них також зустрічаються аллотриплоїди різної геномної композиції – LLR та LRR, – а інколи і дуже рідкісні тетраплоїди та пентаплоїди (Hermaniuk et al. 2013). Частка триплоїдів серед в різних регіонах Європи коливається широко; поодинокі поліплоїди більшої кратності, вочевидь, не доживають до статевої зрілості (Ditte G Christiansen 2009).

В типовому випадку геміклональні гібриди передають нащадкам геном лише одного батьківського виду, в той час як інший елімінується з клітин зародкової лінії (Рис. 1.1). Дослідження *P. esculentus* complex свідчать, що процес елімінації геномів відбувається в клітинах зародкової лінії під час раннього гаметогенезу в зародкових гонадах пуголовків за рахунок формування мікронуклеусів з видаленим геномом, що потім деградує шляхом автофагії (Chmielewska et al. 2018; D. Dedukh et al. 2020). Другий геном підлягає дуплікації, і вже потім проходить мейоз (Dawley і Bogart 1989; Dmitrij Dedukh і Krasikova 2021; Heppich, Tunner, і Greilhuber 1982; H.G. Tunner і Heppich 1981; H.G. Tunner і Heppich-Tunner 1991). Таким чином, зрілі гамети отримують лише один з батьківських геномів у незмінному вигляді: клональний, що схематично позначається дужками – (R) або (L). Для відновлення гібридного генотипу у потомства, зигота має сформуватися з такої гамети та гамети, що несе інший батьківський геном – в типовому випадку звичайний рекомбінатний, від батьківського виду.

Але сучасні дані дають підстави стверджувати, що цей процес набагато складніший і має різну специфіку в різних регіонах (Hoffmann et al. 2015; O. V. Biriuk et al. 2016). А частина гібридів взагалі мають різного ступеня проблеми з фертильністю: або частина клітин зародкової лінії не поводить себе описаним вище способом і дегенерує (Bobrova et al. 2014; Szydłowski et

al. 2017), або, можливо, виникають гормональні порушення розвитку гонад (Norris і Lopez 2011).



Рисунок 1.1. Типовий набір процесів, що забезпечують геміклональне успадкування (за batrachos.com)

P. esculentus подекуди досі виникають від первинних схрещувань між батьківськими видами (Polls Pelaz 1994), але найчастіше існують у змішаних популяціях, де гібридні форми співіснують з батьківськими, залежачи від них репродуктивно – їх традиційно називають «популяційними системами» або «геміклональними популяційними системами» (ГПС), або скорочено просто «системами» (D. Shabanov et al. 2020). І типовий випадок мав би передбачати гаметогенез у *P. esculentus* з елімінацією геному того батьківського виду, з яким співіснує даний гібрид: поряд з *P. lessonae* у *P. esculentus* елімінується L-геном, поряд з *P. ridibundus* у *P. esculentus* елімінується R-геном. Але наразі відомо про існування (подекуди – поширеність) ГПС, в яких гібриди формують декілька типів гамет з різними батьківськими клональними геномами одночасно: (L) та (R). Це явище було вперше описане на самцях і назване «амфіспермією», але потім підтверджене і для гібридних самиць також, тож його наразі пропонується описувати терміном «амфігаметичність»

(«amphigameticity»; [Pustovalova et al. 2022](#)). Амфігаметичність свідчить про механізми, які здатні регулювати «вибір» геному, який підлягає елімінації, але ці механізми наразі невідомі. Склад популяційної системи не є єдиним визначним параметром цього процесу: в багатьох ГПС з наявністю лише одного батьківського виду гібриди продукують суміші гамет з обома геномами ([Biriuk et al. 2016](#)).

Також відомим наразі є факт продукування гібридами *P. esculentus*, разом з гаплоїдними, диплоїдних гамет різного геномного складу: LL, RR, LR (наприклад, [Berger, Hotz, i Roguski 1986](#)). Диплоїдні гамети, будучи заплідненими гаплоїдними гаметами, породжують триплоїдних гібридів LLR та LRR. Автотриплоїдні особини (LLL, RRR) ([Nicolas B. M. Pruvost, Hoffmann, i Reyer 2013](#)), так само як і тетраплоїди ([Leo J Borkin et al. 2004](#); [Ditte G Christiansen 2009](#); [Dmitriy Dedukh et al. 2019](#)) та пентаплоїди ([Hermaniuk et al. 2013](#)), були зареєстровані поодинокі і, вочевидь, не виживають і не впливають суттєво на генетичні процеси у ГПС. Самі триплоїди практикують не менш широкий спектр типів гаметогенезу. Для них відомі і типові для *P. esculentus* гаплоїдні гамети, і диплоїдні гамети; в деяких ГПС триплоїдні *P. esculentus* також здатні продукувати кілька типів гамет одночасно ([Biriuk et al. 2016](#)).

Кожен представник *P. esculentus* complex має екологічні відмінності, що визначає їхнє розповсюдження (зокрема в Україні) а отже і формування різних за складом ГПС. Озерна жаба розповсюджена в переважній кількості водойм різного типу і поширена на більшості території України. Ставкова жаба в приурочена до менших водойм, а її розповсюдження в Україні обмежується лісовою та лісостеповою зоною. Їстівні жаби (а отже, і геміклональні системи) поширені на всьому ареалі ставкової жаби, а також поза ним: на півночі та заході Європи, в басейні Сіверського Донця та в південній течії Дніпра ([Pysanets 2014](#)).

Усі ці три форми мають і морфологічні відмінності, що зазвичай є надійними, якщо аналізуються у комплексі. Також чіткими є акустичні

відмінності шлюбної пісні обох батьківських видів та гібридів. Для триплоїдних форм не відомо надійних критеріїв для морфологічного чи акустичного визначення, втім відомо про залежність прояву морфологічних ознак від дози генів того чи іншого геному (Kierzkowski et al. 2013; Hoffmann i Reyer 2013).

1.2. ГПС *Pelophylax esculentus* complex

Не зважаючи на досі існуючу здатність *P. lessonae* та *P. ridibundus* інколи породжувати життєздатних гібридів, переважна кількість гібридних ліній існує, відтворюючись самотійно у схрещуваннях з батьківськими видами та між собою у складі ГПС. Склад геміклональних популяційних систем варіює та має певну географічну та, вірогідно, екологічну компоненти (Arioli, Jakob, i Reyer 2010; Hoffmann et al. 2015; Dmitry Dedukh et al. 2015; O. V. Biriuk et al. 2016; Dufresnes i Mazera 2020).

Традиційна класифікація ГПС ґрунтується на співіснуванні гібридів з іншими формами. В разі співіснування *P. esculentus* лише з *P. lessonae* ГПС буде належати до L-E типу («*lessonae-esculentus*»); це, вірогідно, предковий тип ГПС (Dufresnes i Mazera 2020). В разі співіснування *P. esculentus* лише з *P. ridibundus* ГПС буде належати до R-E типу; такі ГПС, ймовірно, виникли незалежним чином в різних частинах свого ареалу (Dufresnes i Mazera 2020). Проживання обох батьківських видів разом з гібридами створює ГПС L-E-R типу (Herczeg et al. 2017). Окремий тип ГПС утворюють системи, що складаються лише з гібридних особин – E-E чи просто E тип. Така класифікація не покриває усе різноманіття систем, відомих для *P. esculentus* complex. Наприклад, в ній ніяк не відображається наявність такого елемента геміклональних популяційних систем як триплоїдні гібриди. Тому було також запропоновано доповнити традиційну класифікацію: додаткове позначення «-Er» має вказувати на присутність триплоїдних гібридів. Сучасні дані щодо

різноманіття систем дають підставу використовувати також літери «f» та «m» на позначення присутності триплоїдів виключно однієї статі (наприклад, «-Erf» – триплоїди представлені лише самицями) (Шабанов 2015). Цей підхід гіпотетично можна розширювати, доповнюючи позначення генотипами присутніх триплоїдів.

А, з огляду на доступний різним формам гібридів гаметогенез, наявність триплоїдних гібридів може грати суттєву роль у динаміці системи.

В будь-якій ГПС лінії геномів, що передаються клонально з покоління у покоління, приречені деградувати під тиском накопичення мутацій, що відбувається за систематичної відсутності рекомбінації (храповик Мюллера; Muller 1964; Vorburger 2001; Guex, Hotz, i Semlitsch 2002). Як вважається, переважно саме на цьому ґрунтується феномен смертності гібридолізного потомства: представників батьківського виду, що утворюються від схрещування гібридів, які передають той самий геном клонально – особин (R)(R) чи (L)(L) (Reyer, Arioli-Jakob, i Arioli 2015). Така деградація окремих клональних ліній геномів може бути «амортизована» за рахунок рекомбінації, що спіткає клональний геном в черговому поколінні. В одному варіанті це можливо, якщо він дасть початок батьківській формі за рахунок поєднання з рекомбінантним геномом, і утвориться особина R(R) чи L(L) (наприклад, Doležalková-Kašánková et al. 2021). Цей варіант також потенційно можливий у разі поєднання двох клональних геномів – але суттєво відмінних один від одного (Vorburger 2001b).

Інша опція полягає у потраплянні такого геному в генотип триплоїда, де у нього виявиться пара. Для повністю гібридних ГПС E-типу, описаних з території північної Європи характерною є значна частка триплоїдних гібридів у складі (за більш складною класифікацією це E-Erf ГПС) (Christian Jakob 2007; D G Christiansen i Reyner 2011; N. B. M. Pruvost et al. 2015). Було показано, що триплоїдні гібриди в деяких таких ГПС виконують роль сексуальних видів, продукуючи гаплоїдні рекомбінантні гамети за рахунок кросинговеру між

своїми двома конспецифічними геномами: між LL у LLR, між RR у LRR, – тим самим підтримуючи різноманіття геномів у системі (Christiansen і Reyer 2009; Pruvost et al. 2015) (Рис. 1.2).








males \ females	LR 	LLR 	LRR 
LR  	LRR	RR	LRR
LLR 	LR	LL	LR
LRR 	RR	LR	RR

Рисунок 1.2. Типовий гаметогенез гібридів у Е-ГПС північної Європи; сірим відмічені форми, що елімінуються (за Reyer, Arioli-Jakob, і Arioli 2015)

Е-тип ГПС, що складається лише з диплоїдних гібридів LR, на даний момент потребує ґрунтовніших підтверджень для свого існування, хоча потенційно і зареєстрований (Dubey et al. 2019). Але гіпотетично він мав би підтримуватися існуючими в ньому кількома лініями клональних геномів обох видів, (L) та (R), що продукувались би або різними гібридами, або амфігаметичними особинами (і самцями, і самицями) (Dubey et al. 2019; D. Shabanov et al. 2020).

В інших ГПС триплоїдні гібриди демонструють інші ролі. Так, для кількох популяційних систем Словаччини відомі триплоїдні самці LLR, що «репродуктивно паразитують» на диплоїдних гібридах, відтворюючись за рахунок власних диплоїдних сперматозоїдів (LL) та клональної ікри (R) від LR-самиць – що в свою чергу залежать від місцевих *P. lessonae* (система може бути класифікована як L-E-Epm) (Peter Mikulíček і Kotlik 2001; Peter Mikulíček et al. 2015; N. V. M. Pruvost et al. 2015).

Відомий гаметогенез триплоїдів не обмежується цим. Зазвичай триплоїди схильні продукувати гаплоїдні гамети (наприклад, Dedukh et al. 2022). В

басейні р. Сіверський Донець (Харківська область, Україна) відома R-E-Epf ГПС, де LLR-самиці продукують (очевидно, клонально) (R)-гамети, роблячи внесок у відтворення LR та RR форм і відтворюючись самі за рахунок диплоїдних гамет LR-гібридів (O. V. Meleshko, Korshunov, і Shabanov 2014; Dmitry Dedukh et al. 2015). В іншій R-E-Epf ГПС для нечисленних LLR-самиць припускається здатність утворювати LR-ооцити. Здатність обох форм триплоїдів продукувати R-гамети та здатність LLR-триплоїдів продукувати L-гамети відома для басейну Сіверського Донця загалом. Рекомбінація у триплоїдів сходу України припускається, але досі не підтверджена точними методами. Були зареєстровані, але дотепер (до цієї роботи автора) достоту не описані R-E ГПС з триплоїдами однієї статі в якості єдиної гібридної форми у системі (R-Epf ГПС; [Drohvalenko et al. 2017](#)).

Відтворення триплоїдів базується, вочевидь, на диплоїдних гаметах. Окрім згаданих таких гамет від самих триплоїдів, такі гамети здатні продукувати диплоїдні *P. esculentus* (Gunther, Uzzell, і Berger 1979; Ditte G Christiansen 2009). Відомий гаметогенез LR-гібридів взагалі включає в себе найрізноманітніші форми: виключно клональні (L) та (R), диплоїдні гамети LL, RR та LR – у різних ГПС вони відомі чи припускаються для різних форм гібридів, – а також нерідко суміш кількох різних типів.

Смертність гібридолізного потомства батьківських видів, проблеми зі фертильністю є, як вважається, складовими механізмів, що діють у всіх (вірогідно) ГПС для підтримання їхнього стабільного існування (Reyer, Niederer, і Hettyey 2003). Також в цю функцію робить, ймовірно, вклад елімінація інших гібридних форм (наприклад, [Doležalková-Kašánková, Pyszko, і Choleva 2022](#)) та різноманіття внутрішньо-популяційних онтогенетичних стратегій у окремих особин (O. E. Usova, Kravchenko, і Shabanov 2015; D. Shabanov et al. 2015).

Окрему роль у внутрішньо-популяційному доборі, вірогідно, грають відмінності гібридного та батьківських фенотипів та поведінкових

особливостей. Озерна жаба *P. ridibundus* здатна виживати у великих водоймах та водотоках, витримує деяку солоність води та толерує більше забруднення – але є найбільш чутливим до вмісту кисню в воді українським видом зелених жаб (Plötner 2005); зимує у воді (Leszek Berger і Berger 1992), хоча і здатна до тривалих пересувань по суходолу. Ставкова жаба *P. lessonae* тяжіє до менших водойм, часто лісових та стоячих, боліт, озер та ставків, меліоративних каналів та стариць річок і зимує на суходолі (Pysanets 2014), при цьому здатна мігрувати на багато кілометрів (Heinz G. Tunner і Karpati 1997). Гібриди ж мають більшу витривалість щодо гіпоксичних умов (Hotz et al. 1999) та схильні до далеких міграцій (Holenweg і Reyer 2000). Триплоїдні особини можуть демонструвати вищу толерантність до низьких температур (Nicolas V. M. Pruvost, Hollinger, і Reyer 2013), а вибір їхніх умов зимівлі пластичний (Holenweg і Reyer 2000); до того ж різні триплоїди можуть демонструвати екологічні преференції, подібні до батьківських форм (C Jakob, Arioli, і Reyer 2010). У ГПС також нерідкісні асортативні схрещування (Som, Anholt, і Reyer 2000), за яких самці однієї з форм переважно обирають самиць іншої, наприклад, через більші розміри (*P. ridibundus*) і, отже, більшу потенційну плодючість, або через агресивнішу поведінку самців певних форм (*P. lessonae*) (L Berger 1970; Abt і Reyer 1993; Hoffmann, Abt Tietje, і Reyer 2015).

1.3. Вивченість *Pelophylax esculentus* complex в Україні

Гібридогенний комплекс зелених жаб в Україні вивчався переважно в аспекті розповсюдження тих чи інших видів у його складі (наприклад, Pysanets 2007; Pysanets 2014; Куриленко і Вервес 1999; Булахов, Гассо, і Пахомов 2007). Ці дослідження, в свою чергу, були логічним продовженням та уточненням існуючих до того фауністичних праць, присвячених виключно чи в тому числі земноводним, часів до незалежності України (Terentiev 1950; Vannikov і

Denisova 1956; Банников, Даревский, і Рустамов 1971; Щербак і Щербань 1980; Щербак 1989; Кузьмин 1999) та реєстрації і опису окремих ГПС.

Дисертаційна робота Некрасової (Некрасова 2002) була присвячена поширенню *P. esculentus* complex на території Середнього Придніпров'я.

Досліджень комплексу зелених жаб України, що покривало значну її територію, було проведено за допомогою аналізу алозимів білків (Межжерин et al. 2010).

Різноманіття, включно з морфологічним, зелених жаб у ГПС Західної України було проаналізовано у дисертаційній роботі Стах (Струс) (Струс 2019), а до того підкріплено серією досліджень (В. Стах et al. 2014; V. O. Stakh і Khamar 2014; V. Stakh, Reshetylo, і Khamar 2016; V. O. Stakh et al. 2017; V. O. Stakh, Strus, і Khamar 2018).

Свіжі (1-2 декади ХХІ сторіччя) дані з поширення, екологія та морфологічні показники зелених жаб, включаючи гібридів, у Передкарпатті та Зовнішніх Карпатах були висвітлені у працях Смірнова (Н. Смірнов 2014; Скільський, Смірнов, і Мелешук 2015; Н. А. Смірнов і Скільський 2010; Смирнов 2009; 2007).

Актуальне (станом на 2022 рік) поширення видів *P. esculentus* complex, разом з деякими деталями складу їхніх геміклональних популяційних систем та екології, зокрема на Правобережному Поліссі, були досліджені у роботах Марущака (О. Марущак 2022; А. Ю. Марущак et al. 2017; Kuzmin et al. 2020).

Розповсюдження та склад різних типів ГПС та популяцій батьківських видів на півдні України було більш-менш підсумовано у працях Сурядної та співавторів (Сурядна і Микитинець 2008; Suryadna 2010; Suriadna et al. 2020).

Інакша ситуація склалася з вивченням басейну річки Сіверський Донець на сході України, який був набагато більш ретельно досліджений впродовж останніх десяти років. Територію всього басейну було свого часу описано під назвою «Сіверсько-Донецький центр різноманіття зелених жаб» – за надзвичайне різноманіття і широке розповсюдження різних типів ГПС (D. A.

Shabanov, Korshunov, і Kravchenko 2009). Для центру характерні і достатньо розповсюджені ГПС з триплоїдними *P. esculentus* у складі, серед яких зустрічаються обидві генетичні форми. На всій території басейну Донця зустрічається лише один батьківський вид – *P. ridibundus*, що є елементом усіх ГПС (тобто, Е-ГПС також не було зареєстровано); дорослі *P. lessonae* жодного разу не зареєстровані, хоча подекуди присутні на ранніх етапах розвитку. Відомі поодинокі випадки реєстрації тетраплоїдних гібридів (Leo J Borkin et al. 2004).

Для даного центру було запропоновано класифікацію його території (Рис. 1.3) за типом розповсюдження на окремих частинах ГПС. Територію правих приток української території Сіверського Донця у його північній течії було названо R-E-субрегіоном, район басейну умовно нижче впадіння р. Оскол – R-Epf-субрегіоном, а русло Донця між ними – найскладніший R-E-Eр region.

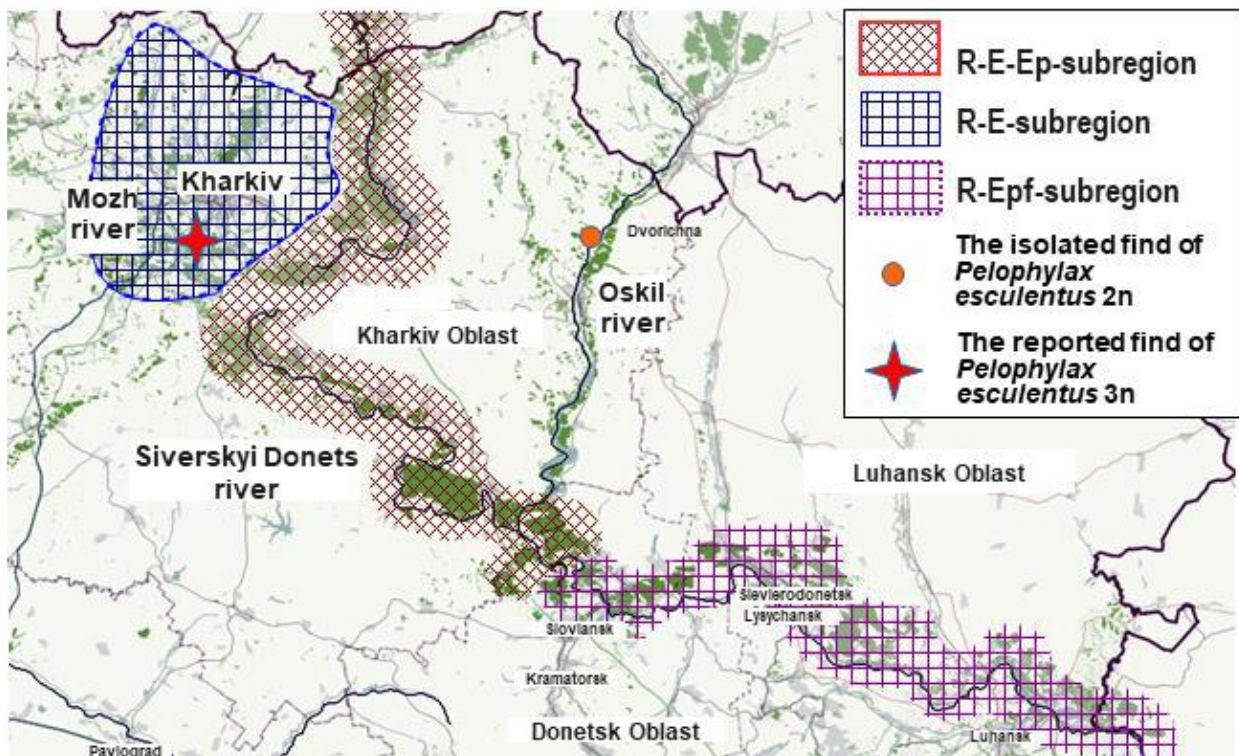


Рисунок 1.3. Класифікація території Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб за Шабанов 2015 з доповненнями за [Drohvalenko, Pustovalova, і Fedorova \(2021\)](#)

Суттєва частина існуючих на даний момент знань про особливості гаметогенезу та розмноження у *P. esculentus* complex були так чи інакше отримані на матеріалі чи з залученням матеріалу з Сіверського Донця (Dmitry Dedukh et al. 2015; Hoffmann et al. 2015; O. V. Biriuk et al. 2016; Dmitry Dedukh et al. 2017; D. Shabanov et al. 2020; Doležálková-Kašánková et al. 2021; Eleonora Pustovalova et al. 2022).

Останні докладні дослідження розповсюдження окремих форм і видів в області були проведені у роботах членів лабораторії популяційної екології амфібій ХНУ імені В.Н. Каразіна (Шабанов 2015; Шабанов et al. 2017; Дрогваленко et al. 2018), зокрема Коршунова (Коршунов 2010; Korshunov 2008; Zinenko, Korshunov, і Turikov 2014). Суттєву роль у дослідженні *P. esculentus* complex цього регіону зіграв НПП «Гомільшанські ліси», біологічна станція на території якого дозволила роками стало проводити моніторинг кількох з найскладніших та найцікавіших популяційних систем (Іськів, Коряків, Добрицький ставки; див. пункт 3.6), в т.ч. і в рамках студентської практики.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Територія досліджень

Територія, охоплена дослідженнями (Рис. 2.1), включає в себе водойми в межах таких адміністративних областей України: Харківська, Сумська, Полтавська, Київська, Луганська, Донецька, Запорізька, Херсонська, Чернівецька та Львівська області. Охоплені дослідженням водойми включають в себе:

Харківська область: русло, стариці і прируслові озера в поймі річки Сіверський Донець (м. Зміїв, с. Гайдари, с. Задонецьке, м. Ізюм), Печенізьке водосховище на річці Сіверський Донець (с. Мартове), штучні ставки у ярах, що впадають в долину річки Сіверський Донець (Коряків став, с. Гайдари; став у селі Замулівка); ділянки прируслової заплави та штучних каналів річки Уди (кілька окремих ділянок в м. Харків), штучні ставки в ярах, що впадають в долину Уд (с. Хорошеве, а також с. Водяне та м. Люботин), Удянський гідропарк на річці Уди (м. Харків); русло і прируслові ділянки річки Лопань в районі Олексіївського Лугопарку та Мирського гаю (м. Харків), штучні ставки, що створені у ярах, що впадають в долину Лопані (с. Слатине, с. Мала Данилівка), затоплені кар'єри в межах долини Лопані (кілька різних ділянок у м. Харків); Олексіївське водосховище (річка Олексіївка, м. Харків); ставок Комсомольський (річка Саржинка, м. Харків); русло річки Харків та Журавлівський гідропарк (м. Харків), система штучних ставків в яру, що впадає до долини річки Харків (ур. «Ольхова балка», с. Борщова); русло, заплавне озеро і став у яру, що впадає до долини річки Жихорець (м. Харків); озеро і заплава струмка в межах долини річки Сухий Жихор (м. Харків); штучний став у яру, що впадає до долини річки Мерефа (Орсовський став, м. Південне); прируслові ділянки і притерасне озеро заплави річки Мож (с. Тимченки), штучні стави в ярах, що впадають до долини річки Мож (Іськів

став, с. Гайдари; ставки біля с. Бірки); штучний став в яру, що впадає до долини річки Гомольша (Добрицький став, околиці с. Суха Гомольша); русло річки Оскол та штучний ставок у яру, що впадає до долини Оскола (м. Дворічна та околиці с. Красне Перше); система боліт в межах тераси річок Мерла та Мерчик (с. Сорокове, м. Краснокутськ); узбережжя та околиці озера Лиман (с. Лиман).

Донецька область: заплавні озера річки Сіверський Донець (с. Брусівка).

Луганська область: притерасна стариця та озера тераси річки Сіверський Донець (м. Кремінна).

Сумська область: штучний став на річці Олешня (с. Кияниця); штучний став на річці Битиця (с. Вакалівщина), а також русло і прируслові ділянки річки Псел (с. Битиця); штучний став на річці Стрижень (с. Воргол); русло річки Клевень (с. Литвиновичі); русло та заплавне озеро річки Сейм (с. Камінь, с. Спаське).

Полтавська область: русло, прируслові ділянки та заплавні озера річки Удай (м. Пирятин, с. Леляки, с. Дейманівка, с. Харківці), штучний ставок у яру, що впадає до долини Удая (став Каплинці); русло річки Перевод та русло річки Руда (с. Сасинівка).

Київська область: русло (м. Чорнобиль) і заплавні озера річки Прип'ять; обвідний канал ставка-охолоджувача Чорнобильської АЕС, русло і заплавні озера річки Уж (м. Чорнобиль), меліоративні канали в долині річки Уж (с. Залісся); меліоративні канали і русло річки Ілля.

Запорізька область: русло і заплавні озера річки Дніпро на острові Хортиця (м. Запоріжжя).

Чернівецька область: прируслові озера річки Прут (м. Чернівці), струмки басейну Прута (ур. Цецино); риборозвідні ставки на річці Совиця (с. Шипинці).

Львівська область: заплавні озера річки Кам'янка (с. Жовтанці); обвідний канал водосховища біля Добротвірської ТЕЦ на річці Західний Буг (с. Перекалки).

Херсонська область: солоні та прісні озера Чорноморського біосферного заповідника (Івано-Рибальчанська та Соленоозерна ділянка); берег Дніпро-Бузького лиману (с. Бузова); русло річки Конка (рукав Дніпра, м. Гола Пристань); водойми острова острів Джарилгач.



Рисунок 2.1. Локалітети досліджень на мапі України; деякі локалітети позначені об'єднаним маркером через міркування масштабу

Територія досліджень охопила наступні об'єкти ПЗФ України (включно з підпорядкованими об'єктами ПЗФ нижчого статусу): НПП «Гомільшанські ліси», «Дворічанський», «Слобожанський», «Пирятинський», «Кременські ліси» (формально також «Джарилгацький»); РЛП «Сеймський»; ландшафтні заказники «Гарячий Урбан», «Цецино»; національний заповідник «Хортиця»;

біосферні заповідники «Чорноморський», «Чорнобильський радіаційно-екологічний».

2.2. Польові дослідження

Польові дослідження проводилися протягом 2018-2023 років. В переважній кількості випадків польові експедиції відбувалися в період з травня по серпень. Цей охоплює нерестовий період, який для зелених жаб в Україні припадає на травень-червень, а також період розвитку та метаморфозу ювенільних особин. В окремих випадках фауна зелених жаб досліджувалася восени або в другій половині квітня.

Польова робота включала в себе піше маршрутне чи точкове обстеження обраної території та/чи окремих водойм, а також цілеспрямоване взяття вибірок з окремих популяційних систем для подальшої лабораторної роботи. Визначення знахідок зелених жаб відбувалося за рахунок морфологічного обстеження пійманих особин (див. відповідний пункт), а також за рахунок візуальних спостережень тварин у природі.

Окремим інструментом реєстрації видів у польових умовах була видоспецифічна вокалізації самців. Шлюбна пісня самців *P. ridibundus* має характер уривчастого розкатистого «реготання», у самців *P. lessonae* – довгої високої майже неперервної «трелі», в той час як гібридні форми мають проміжний характер пісні – довга трель з відчутним деренчанням, тобто більш уривчаста, ніж у ставкової жаби (Рис. 2.2). Окремі дослідження встановили відмінності у співах триплоїдних гібридів (Hoffmann і Reyer 2013), однак ці дані не становлять допоміжного польового характеру.

Відлов здійснювався за допомогою герпетологічного сачка (довжина 1.3 м, діаметр обруча 40 см, розмір вічка 1 см) або вручну. Для ефективного виявлення та відлову жаб в нічний час доби використовувалися ліхтарі, за допомогою яких тварини тимчасово засліплювалися та ловилися з набагато

меншим для них самих стресом. Для доступу до водойм використовувалися рибацькі чоботи та надувний човен.

Для дослідження динаміки чисельності окремих ізольованих геміклональних популяційних систем використовувався метод мічення з повторним відловом. Дорослі жаби мітилися шляхом відрізання кількох дистальних фаланг пальців на задніх та передніх кінцівках у певній комбінації, унікальній для кожного року мічення. Серед наступної вибірки з цієї ж водойми (іноді того ж року, частіше наступного) проводилася реєстрація міток попередніх років. Чисельність популяційної системи оцінювалася за формулою Пітерсона-Бейлі (Caughley 1977).

Після здійснення необхідних промірів і взяття необхідних зразків тканин всі жаби, які не були призначені для подальшого використання у схрещуваннях або не підлягали забиттю (наприклад, для взяття каріологічного матеріалу), випускалися до місць їхнього відлову.

2.3. Утримання тварин

2.3.1. Утримання дорослих жаб

Щойно відловлені тварини поміщалися у рибацьке знаряддя, призначене для утримання риби (наприклад, карпові мішки), герпетологічні мішки або одразу у пластикові контейнери.

Довгостроково дорослі жаби утримувалися у пластикових харчових контейнерах з отворами для вентиляції або скляних банках чи акваріумах. У кожному ємності були додані матрацики з пористого м'якого поліетилену, які утримували вологість у ємності на необхідному рівні, а також ємності з водою для доступу тварин до води для зволоження; ємності та матрацики очищалися і вода змінювалася щодня. Утримуваних дорослих тварин годували кормовими комахами (тарганами, цвіркунами, мучним хробаком) або м'ясом (курячим філе, свинячим серцем). Порції їжі для жаб збагачувалися кальцієво-

вітамінною добавкою (мелена шкаралупа курячих яєць з вітаміном D). Дрібних жаб (переважно цьогорічок) додатково годували рибальським мотилем та трубочником.

Частина жаб з особливо цікавих популяційних систем, призначена для подальших схрещувань, утримувалась на приватних (Дмитра Шабанова) ділянках з басейнами у напівприродніх умовах з можливістю зимівлі (за прикладом [Baker et al. 2011](#)).

2.3.2. Утримання пуголовків і метаморфів

Пуголовки відловлювалися у природі таким само сачком або меншим акваріумним сачком діаметром до 20 см (Dodd 2010). Відловлені з природи чи отримані в результаті штучних лабораторних схрещувань (див. пункт 4.2) пуголовки утримувалися в пластикових контейнерах чи скляних акваріумах. Об'єм води підтримувався на рівні ≥ 1 л на 1 пуголовка. Використана вода бралася з харківського водопроводу з наступним відстоюванням не менше доби для дегазації (дехлорування) і осідання можливого осаду, або (за можливості) з природніх водойм-батьківщини спійманих пуголовків. Для годування пуголовків використовувався корм для донних акваріумних риб TetraMin (Tetra, USA). Аерація здійснювалася за рахунок акваріумного аератора Atman AT-7500. Режим освітлення підтримувався за рахунок природнього сонячного світла. У випадках лабораторного утримання пуголовків в холодну пору року, температура в ємностях з пуголовками стабілізувалася за рахунок акваріумного термоконтролера Tetra HT200, що монтувався у зовнішню ємність з водою.

Для метаморфозу ємності з пуголовками були обладнані острівцями з піщанику майже на рівні води, або їм надавався певних нахил – аби імітувати суходіл, на який мають виходити молоді жаби, які щойно завершили метаморфоз.

Методи, що використовувалися задля отримання експериментального потомства, були здебільшого розроблені та апробовані нашою робочою

групою під конкретно наші потреби, а тому описані у відповідних розділах (пункт 4.2).

2.4. Морфологічні методи

Види роду *Pelophylax*, задіяні в дослідженнях (*P. ridibundus*, *P. lessonae*, *P. esculentus*) не містяться у Червоній Книзі України, а також зазначені у Червоному Списку МСОП (IUCN) як такі що «Викликають найменше занепокоєння» («Least Concerned»). Методи, використані для відлову, взяття зразків чи евтаназії тварин, були спрямовані на зменшення страждань тварин у відповідності до Директиви ЄС 2010/63/EU «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (OJ L 276, 20.10.2010), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006), а також були схвалені комісією з біоетики ХНУ імені В.Н. Каразіна (протокол № 1/23 від 15.03.2023). Всі пошкодження, завдані живим тваринам, не призначеним для забиття, оброблялися антибіотиком біциліном («Біцилін-5», Arterium, Україна).

2.4.1. Розміри тіла

В якості інтегральної оцінки розмірів тварини, у досліджуваних жаб вимірювалася довжина від кінця морди до кінця уростиля; це є параметром, аналогічним до SVL (snout-vent length), але не прив'язаним до м'яких тканин. Така довжина або вимірювалася штангенциркулем (точність 0.1 мм), або фотограмметрично, аналізуючи фотографію тварину поряд з масштабним об'єктом (лінійкою, міліметровою сіткою) (Рис. 2.3а).

Для найменших особин, вірогідно пройшовших метаморфоз в той самий рік, використовується термін «цьогорічки». Для особин, що перебувають в процесі метаморфозу (стадії 42-45, вже з 1-2 передніми лапами), тут використовується термін «метаморфи». Усі молоді особини тут називаються

також «ювенільними» або просто «нестатевозрілими» (зазвичай з SVL~45 мм та менше); вид таких особин визначається з надійністю, яка збільшується з їхніми розмірами, стать таких особин визначається не завжди.

2.4.2. Видова ідентифікація

Первинна видова ідентифікація (на етапі спостережень та/або відлову) зелених жаб здійснювалася за допомогою комплексу зовнішньо-морфологічних ознак, перш за все за характером забарвлення різних частин тіла та співвідношенням розмірів різних частин тіла (Plotner 2005; Berger 2008; Kierzkowski et al. 2011; 2013; Шабанов 2015).

Серед найінформативніших ознак слід згадати наступні:

- забарвлення спини – для озерних жаб більш характерне переважання зелених і темно-зелених тонів, плям неправильної форми, часто великих і теж зеленого кольору, в той час як для ставкової і озерної характерні світліші тони, дрібніші і завжди темні плями, більш виражена смугастість вздовж спинних валиків;
- дорзомедіальна смуга – відсутність дорзомедіальної смуги майже однозначно ідентифікує особину як *P. ridibundus*, оскільки за такий стан ознаки відповідний рецесивний алель гену, який у наших видів зелених жаб зустрічається лише в геномі озерних жаб (Leszek Berger і Smielowski 1982);
- форма внутрішнього п'яткового горбка – він великий і округлий у ставкових жаб, менший скошено-округлий у їстівних та невеликий скошений у озерних (Рис. 2.2);
- колір зовнішніх резонаторів (у самців) – темний у озерних жаб, світлий у ставкових та сірий у гібридів;
- співвідношення довжини стегна до довжини гомілки – збільшується у ряду озерна-їстівна-ставкова (Рис. 2.2);

- забарвлення внутрішньої поверхні стегон – жовтизна (що переходить на боки тулуба) посилюється у ряду озерна-істівна-ставкова, візерунок у озерної жаби простіший (крапки і плями), ніж у істівної чи ставкової (плями складної форми);
- плямистість передніх кінцівок – відсутність поперечних смуг свідчить на користь ставкової жаби (Некрасова 2002);

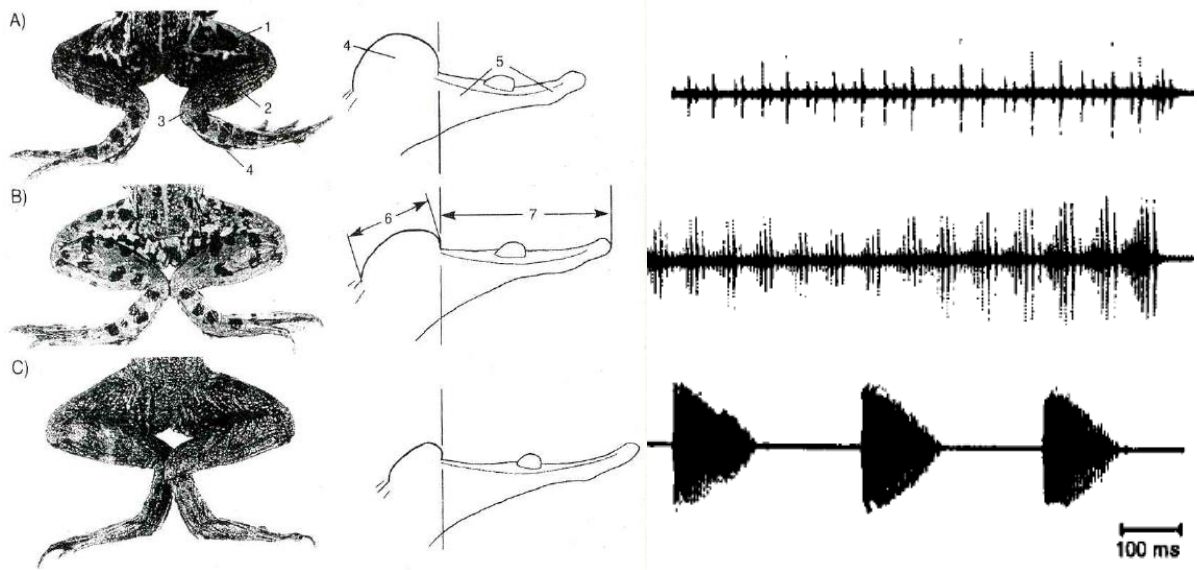


Рисунок 2.2. Пропорції ніг і горбка (ліворуч) та осцилограми шлюбних пісень (праворуч) у *P. lessonae* (A), *P. esculentus* (B), *P. ridibundus* (C) однакової довжини 75 мм (за Berger 2008 та Plotner 2005)

Вищепераховані ознаки однозначно слід використовувати у комплексі, адже деякі стани окремої ознаки можуть бути характерними для кількох видів (наприклад, жовтизна стегон), а деякі складно однозначно класифікувати для окремої особини (наприклад, висота горбка чи характер малюнка спини). Варто додати, що зареєстровані випадки нехарактерного стану якоїсь окремої ознаки – наприклад, відсутності дорзомедіальної смуги у 1 особини гібрида (за всіма іншими ознаками) з річки Псел (пункт 3.3.3) чи на Львівщині (Стах et al. 2014).

Також, слід зважати на вплив кількості геномів того чи іншого виду у проявленні зовнішньо-морфологічних ознак у триплоїдів різного геномного складу – LRR-*P. esculentus* можуть виявитися подібнішими до *P. ridibundus*, а LLR-*P. esculentus* до *P. lessonae* та LR-*P. esculentus* (Kierzkowski et al. 2013).

Підтверджено-надійної методики для зовнішньо-морфологічного визначення триплоїдних *P. esculentus* наразі не розроблено.

Слід зазначити, що для молодих особин зовнішньо-морфологічне визначення може бути оманливим через недостатній розвиток у молодих дрібних тварин тих чи інших частин тіла (наприклад, п'яtkового горбка чи правильних пропорцій частин кінцівок) або забарвлення. Зовнішньо-морфологічне визначення цьогорічок з озера долини річки Мож (с. Тимченки) помилково віднесло до *P. ridibundus* особин, які пізніше були визначені каріологічно як триплоїдні *P. esculentus* (Drohvalenko et al. 2021).

Метод надійної видової ідентифікації пуголовків зелених жаб за зовнішню морфологією досі не розроблений. Від пуголовків інших видів безхвостих амфібій пуголовків зелених жаб відрізняє загальний габітус, помітно зеленіше забарвлення тіла, форма і розташування хвостового плавця, зубна формула та інколи помітний малюнок, що нагадує малюнок дорослих жаб, у великих пуголовків на пізніх стадіях.

Для всіх пуголовків була визначена стадія розвитку (за Gosner (1960)), що ідентифікується морфологічно і базується на ступені розвитку оперкулума, зачатків передніх та задніх кінцівок і врешті на етапі метаморфозу.

2.4.3. Статева ідентифікація

Зовнішньо-морфологічне визначення статі зелених жаб базується передусім на ідентифікації ознак, притаманних самцям – а за їх відсутності робиться висновок про приналежність особини до жіночої статі.

Ознаки, характерні для самців зелених жаб:

- наявність зовнішніх резонаторів, розташованих в кутках рота – розкриті під час співу, вони можуть бути непомітні при обстеженні пійманої тварини, а отже потребують або відтягування шкіри по краях рота для виявлення, або імітації амплексусу за допомогою пальців (стискання під пахвами) для провокації характерного крику вивільнення (Anna Fedorova i Shabanov 2022);

- шлюбні мозолі на 4 та 5 (внутрішніх) пальцях, призначені для надійного утримання самиці в амплексусі у воді – легко ідентифікуються за кольором і текстурою.

Дорослі статевозрілі самці також часто характеризуються гіпертрофованою мускулатурою передніх кінцівок, а самиці – більшими максимальними розмірами. Відсутність виражених ознак самців може також означати молодий вік особини, тому для найменших за розміром зелених жаб (цього- і другорічків) ідентифікація статі можлива лише за анатомічними ознаками гонад. Анатомічне визначення статі у дорослих жаб ґрунтується на формі гонад (Ogielska 2009). Сім'яники загалом характеризуються округлою формою, в той час як яєчники видовжені та зернисті за рахунок дозріваючої ікри у статевозрілих самиць в період нересту (наприклад, (Jamieson 2003; Norris і Lopez 2011).

Статева ідентифікація пуголовків можлива лише за морфологією гонад після певної стадії розвитку (стадія >30 за Gosner (1960)). Гонади пуголовків відрізняються складніше: сім'яники характеризуються однорідною структурою і видовженими відростками придатків, а яєчники більш сегментовані і не мають придатку (Ogielska 2009).

Для точного визначення форми зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex застосовується ряд лабораторних методів.

2.5. Цитологічні методи

2.5.1. Вимірювання довжини еритроцитів

Для клітин еукаріотичних організмів в цілому характерне стале ядерно-цитоплазматичне співвідношення, яке забезпечує адекватну взаємодію цитоплазматичних елементів клітини з ядерними. Це, зокрема, означає, що зі збільшенням генетичного матеріалу, а отже і зі збільшенням ядра, має збільшуватися і розмір клітини. Таке було продемонстровано і для комплексу

зелених жаб, для якого характерні триплоїдні геміклональні гібриди (Uzzell і Berger 1975).

Виявилося, що для триплоїдних гібридів характерною є збільшена довжина – а саме розмір довгої осі, – еритроцитів, в порівнянні з будь-якими іншими диплоїдними формами (гібридами чи батьківськими видами) (Plotner 2005; Bondareva et al. 2012; Bondareva, Sedova, і Shabanov 2013). В той час як диплоїдні еритроцити варіюють у розмірах від ~18 до ~25 мкм (zareєстрований лабораторією Популяційної екології амфібій мінімум – 17.46 мкм у гібридного самця з Іського ставу, 2017 рік), триплоїдні еритроцити набувають розмірів від ~26 до >30 мкм (zareєстрований лабораторією максимум – 35.17 мкм у самця з Добрицького ставу, 2017 рік) (Рис. 2.3bc).

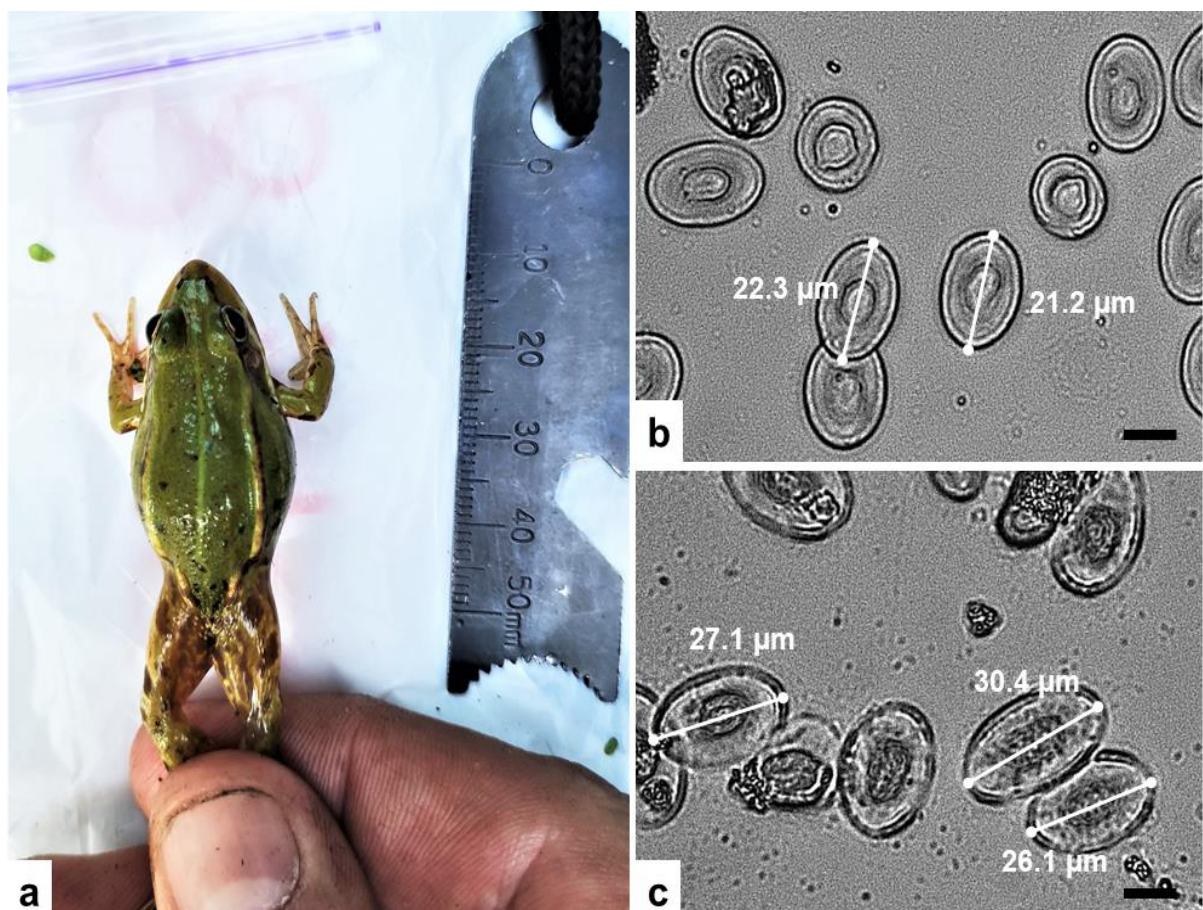


Рисунок 2.3. Фотограмметрия довжини жаби (а), а також диплоїдні (b) та триплоїдні еритроцити (c) (об'єктив x40). За [Drohvalenko і Fedorova \(2022\)](#).

Оцінка плоїдності за довжиною еритроцитів не є досконалою. Ситуації, коли довжина еритроцитів не співпадає з реальною плоїдністю тварини, не є

частими, але є регулярними для дорослих тварин – і набагато більш типові для молодих тварин. Окрім того, конкретна межа довжини еритроцитів, що відділяє триплоїдів від диплоїдів, має оцінюватися для кожної окремої системи.

Але цей метод у більшості випадків дозволяє ідентифікувати принаймні тих триплоїдів, які мають великі клітини.

Еритроцити вимірюють на висушеному на повітрі препараті крові, що була щойно отримана з тварини, без використання фіксаторів та покривних скелець. Для отримання найякісніших препаратів кров має бути розмазана тонким шаром по предметному скельцю; також варто уникати потрапляння на кров води чи шкірного слизу жаби – обидві речовини руйнують еритроцити (перша занадто гіпотонічна, друга пошкоджує їх).

Кров може бути забрана у жаби з черепних вен (Forzán et al. 2012) шляхом проколу шкіри голкою між верхньощелепною кісткою та барабанною перетинкою з наступним забором виступаючої крові дозатором – це найменш інвазивний метод. Інший спосіб полягає у використанні крові, виступаючої при інвазивних маніпуляціях, як-от взяття зразка тканин для аналізу ДНК чи мічення (див. пункт 2.2) – в обидвох випадках зазвичай беруться дистальні фаланги пальців.

Еритроцити жаб, використаних в даному дослідженні, вимірювалися у проникаючому світлі з використанням світлового мікроскопа. Вимірювалося не менше 25 клітин, для оцінки плоїдності використовувалося середнє значення.

2.5.2. Каріологія метафазних пластинок

Цей метод дозволяє прямо оцінити плоїдність тварини, підраховавши кількість хромосом: $2n = 26$, $3n = 39$ (в т.ч. Suriadnaia (2015)). Хромосоми конденсуються на етапі ділення клітини, а тому для зупинки клітин на цьому етапі (найчастіше на стадії метафази, рідше анафази). В якості джерел клітин з регулярним поділом використовувалися епітелій кишечника і червоний

кістковий мозок у дорослих жаб та епітелій кишечника та епітелій зябер у пуголовків (наприклад, [Vegerina et al. 2013](#); [Вегерина, Бирюк, і Шабанов 2014](#)).

Для отримання таких пластинок дорослим жабам проводили ін'єкцію 0.5% колхіцину, який вводили у черевну порожнину (O. Biriuk et al. 2016). Пуголовки утримувалися 12 годину у 0.05% розчині колхіцину. Через 12 годин тварин експонували парам етилацетату (дорослих) чи аптечному розчину лідокаїну (пуголовки) та розтинали. Очищений від непереварених решток кишечник, стегнові кістки з обрізаними епіфізами та/або видалені зябра гіпотонували (0.07 М KCl) та фіксували у розчині Карнуа (суміш 3:1 етанолу та крижаної оцтової кислоти) зі змінами фіксатора за необхідності. Зафіксовані тканини гомогенізували у 70% розчині крижаної оцтової кислоти та розкрапували на розігріте до 60°C скло. Розкрапані таким чином препарати або аналізували одразу на предмет наявності цілих метафазних пластинок, або додатково забарвлювали сумішшю Гімзи (метиленовий синій з еозином та азуром В) (Sumner, Evans, і Buckland 1973) – або AgNO₃. Останній зв'язується також з ядерцевими організаторами у інтерфазі – за кількістю яких можна непрямо оцінити кількість геномів у клітинах досліджуваної жаби (Рис. 2.4).

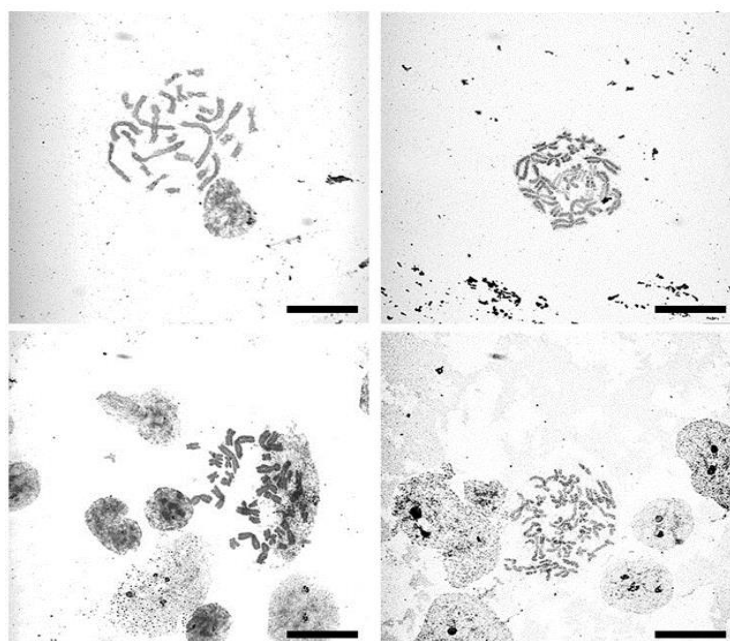


Рисунок 2.4. Забарвлені сріблом метафазні хромосомні пластинки диплоїда ($2n=26$, згори) та триплоїда ($3n=39$, знизу); шкала 20 мкм. Препарати і фото авторства Пустовалової Е.В.

2.5.3. FISH та DAPI-забарвлення

Метод DAPI-забарвлення ґрунтується на різному ступеню зв'язування барвника DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) з (пери)центромерними гетерохроматиновими регіонами в геномах різних видів, що, таким чином, дозволяє розрізнити геноми та визначати геномну композицію гібридів, забарвлюючи вже готові метафазні пластинки (або навіть інтерфазні ядра) (Ogielska, Kierzkowski, і Rybacki 2004; Eleonora Pustovalova, Fedorova, і Shabanov 2022).

Метод флуоресцентної *in situ* гібридизації дозволяє прямо визначити і каріотип, і генотип досліджуваної особини. Він ґрунтується на гібридизації (пери)центромерних повторів у всіх хромосомах генома *P. ridibundus* та 10 та 11 хромосомах генома *P. lessonae* з флюоресцентними зондами, специфічними до цих регіонів, з наступною візуалізацією з використанням флюоресцентного мікроскопа (Ragghianti et al. 1995; Dmitry Dedukh et al. 2015; D. V. Dedukh і Krasikova 2017) (Рис. 2.5). Для обох методів використовувались непофарбовані препарати, виготовлені за тією ж процедурою, що і для простого аналізу метафазних пластинок.

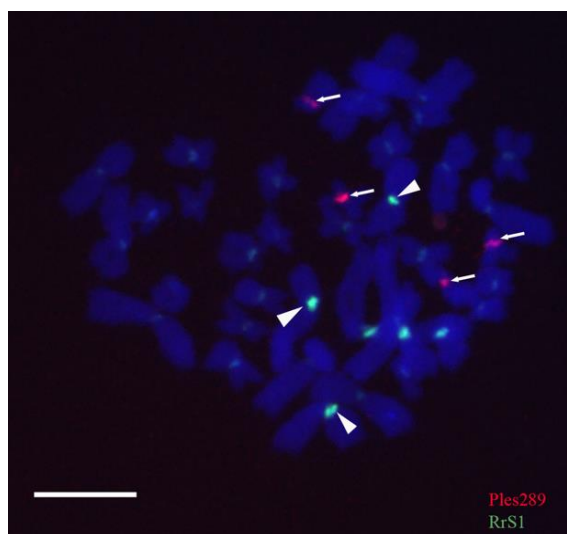


Рисунок 2.5. Візуалізація результатів FISH:

сині – хромосоми, червоні/зелені – (пери)центромерні регіони;

шкала 10 мкм. Препарати і фото авторства Пустовалової Е.В.

Препарати крові та усі препарати метафазних пластинок були проаналізовані, сфотографовані та проміряні за використання мікроскопів Leica DM 2000 (камера DFC3000 G, програмне забезпечення LASX; ХНУ імені В.Н. Каразіна) та Olympus Provis BX53 (камера CCD, програмне забезпечення DP30W Olympus; Інститут фізіології та генетики тварин, Чеська академія наук, Лібехов, Чеська Республіка). Можливість проведення аналізу FISH була надана за сприяння Дмитра Дедука (Laboratory of fish genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, CAS, v.v.i., Liběchov, Czech Republic) – а ця та усі інші каріологічні методики були здійснені Елеонорою Пустоваловою (лабораторія Популяційної екології тварин, ХНУ імені В.Н. Каразіна) чи за її безпосереднього сприяння.

2.6. Молекулярні методи

Обладнання та технічні ресурси для виділення, аналізу та сиквенування ДНК більшості матеріалу, а також програмне забезпечення для аналізу отриманих сирих даних використовувались в рамках співпраці та за сприяння Peter Mikulíček (Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovak Republic).

Генотип частини особин був визначений за допомогою електрофоретичного аналізу розміру послідовності першого інтрона сироваткового альбуміну, SAI1 (serum albumin intron-1) (HAUSWALDT et al. 2012; Plotner et al. 2009) в рамках проекту з дослідження розповсюдження амфібійного патогену *Batrachochytrium dendrobatidis* (Rosenblum et al. 2013) в Україні у співпраці з Maciej Pabijan (Department of Comparative Anatomy,

Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Kraków, Poland).

2.6.1. Зразки та виділення ДНК

Сировиною для виділення ДНК слугували зразки тканин зелених жаб, а саме: кров, фрагменти пальців, ватні мазки шкірного та букального епітелію, фрагменти хвостового плавця пуголовків або цілі пуголовки. Кров та фрагменти пальців за можливості збиралися водночас із забором крові для приготування препаратів еритроцитів та мічення жаб. Цілі пуголовки фіксувалися лише в разі їх дуже молодого віку, коли збір фрагменту хвоста все одно був би фатальним для особини. Всі зразки поміщалися в 96% етанол і потім зберігалися у холодильнику при +4°C та/або морозильній камері при -20°C.

Геномна ДНК виділялася з використанням готових наборів для виділення ДНК E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc, Norcross, GA, USA), застосовуючи методику, рекомендовану виробником. Отриманий продукт перевірявся на якість ДНК шляхом агарозного гель-електрофорезу.

2.6.2. Мікросателітний аналіз

Мікросателітний аналіз ґрунтується на ампліфікуванні (з використанням полімеразної ланцюгової реакції) невеликих тандемних повторів, що містяться у різних ділянках ядерної ДНК тварини (Ditte G Christiansen 2005; Plotner et al. 2007). Частина цих локусів є видоспецифічною – зустрічається лише у геномах певного виду, – частина є крос-специфічною, але геноми різних видів мають різні алелі (Рис. 2.6). Мікросателітний аналіз дозволяє як мінімум ідентифікувати вид зеленої жаби (за набором видоспецифічних локусів, що ампліфікуються), а інколи також плоїдність (триплоїди можуть мати два видоспецифічних алелі). У даному дослідженні мікросателітні локуси використовувалися для аналізу генетичного різноманіття та виявлення ознак клональної передачі у геномах різних видів в окремих популяційних системах.

Locus	<i>P. lessonae</i> -specific alleles	<i>P. ridibundus</i> -specific alleles
RICA5	255/260/263	
RICA18	184/186/188/189/190	
RICA2a34	142/143/145	
CA1a27	104/111	
Ga1a23	107/112/120	
Rrid082A		161/162/167/168/170/180/181/191/195/197
Res22		83/84/85/86/87/88/104/112
Re2Caga3		173/203/207/210/212/214/216/220/221/224/225/228/229/230/232/233/234/237/240/242/243/246/247/250/251/254/258/265/266/270/274
Pper3.22		345/347
Rrid064A		208/209/210/219/223/224/226/230/232
Rrid135A		160/171/173/179/183/192/193/194/195/206/209
Ga1a19		102/104/108/126
Res17		159/171/173
Rrid171A		156/160/175/178/183
Rrid013A	300	284/286/289/290/292
Re1Caga10	83/95/96/112	0/79/82/87
RICA1b6	86	78/80/82/89/91/93/96/98/100/102/108
Pper4.7	400/404/408/412/416/420	280/284/287/291/295/299/303/308/321/355/359/363/366/370/374
RICA1b20	81/83/89	91
RICA1b5	119	131/133

Рисунок 2.6. Визначені у дослідженнях (пункти 5.1, 5.3, 5.4) алелі

Для генотипування жаб використовувані наступні мікросателітні локуси: RICA5, Rrid082A, Res22, RICA18, Re2Caga3, Re1Caga10, RICA1b6, RICA2a34, Rrid064A, Ga1a23, CA1a27, Rrid135A, Rrid013A, Pper3.22, Pper4.7, GA1A19, RICA1b5, RICA1b20, Res17, Rrid171A (Garner et al. 2000; Hotz et al. 2001; Zeisset, Rowe, i Beebee 2001; Nicolas B. M. Pruvost, Hoffmann, i Reyer 2013; Hoffmann et al. 2015; Leuenberger et al. 2014; Sánchez-Montes et al. 2016). Ампліфікування мультиплексів відбувалося з використанням готового набору для ПЦР 2×Qiagen multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany або Qiagen, Valencia, CA, USA).

Протокол ПЦР виглядав наступним чином: 5 хв при 95 °C для початкової денатурації > 30 циклів (30 с при 95 °C > 90 с при 60 °C > 60/30 с при 72 °C) > фінальна елонгація впродовж 30 хв при 60 °C та зберігання у морозильній камері при -20°C.

Продукти ампліфікації були проаналізовані на автоматичному аналізаторі ABI (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) з розмірним стандартом LIZ-500.

Фрагменти були візуалізовані з використанням програмного забезпечення Geneious Prime (Dotmatics, Boston, MA, USA) та зчитані вручну в програмі GeneMarker® (SoftGenetics, USA). Показники генетичного різноманіття та мультилокусні генотипи на основі мікросателітних даних були розраховані у пакеті GenAlEx 6.5 для MS Excel (Rod Peakall і Smouse 2006; R. Peakall і Smouse 2012). Генотипове різноманіття та нерівноважне зчеплення були розраховані у програмі Multilocus 1.3 (Agarow і Burt 2001).

2.6.3. Аналіз SNP у послідовностях

Для визначення видової приналежності та генотипу зелених жаб також був застосований аналіз послідовності ядерного гену *uqcrfs1* – залізо-сірчаного поліпептиду 1, субдиниці убіквінол-цитохром С редуктази (елементу дихального ланцюга мітохондрій). Цей ген містить видоспецифічні точкові поліморфізми (single nucleotide polymorphisms, SNP). Аналіз хроматограм на предмет набору алелів цих поліморфізмів дозволяє визначити наявність геномів ставкової та озерної жаб – батьківські види мають лише один пік в кожному локусі, гібриди мають чітко видні два піки. Дозовий ефект дозволяє визначити генотип: вищі піки на хроматограмі, отриманій при сиквенуванні послідовності, позначають алель, який цей організм має у більшій кількості копій: гібриди LLR мають вищі піки L-специфічних алелів, LRR – вищі піки R-специфічних алелів (Рис. 2.7). Деталі методики виконання та інтерпретації результатів викладені у [Plötner et al. \(2015\)](#) та [Tecker et al. \(2017\)](#).

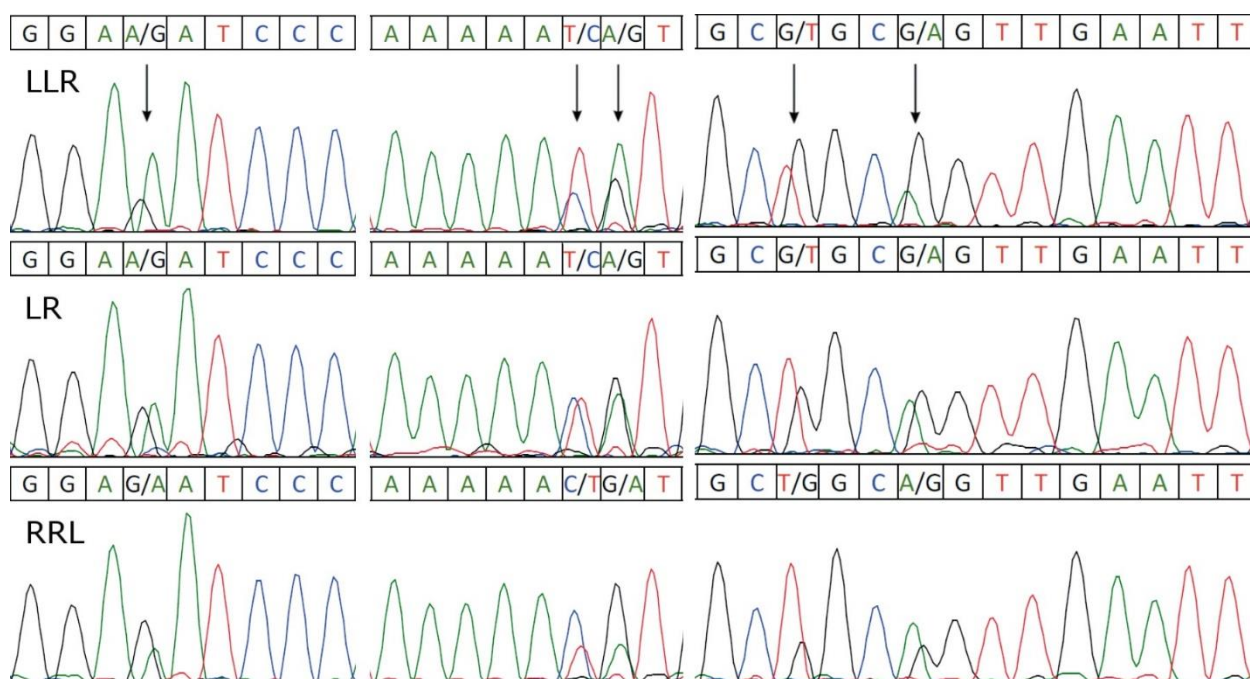


Рисунок 2.7. Дозовий ефект SNP гену *uqcrfs1* допомагає визначати генотип гібридів *P. esculentus* (за Tecker et al. 2017)

Послідовності були проаналізовані за допомогою програми BioEdit v7.1.7 (Hall 1999).

2.7. Статистичний аналіз

Всі розрахунки були проведені з використанням мови програмування R та середовища програмування RStudio (R Core Team 2022). Пакети, що були застосовані для розрахунків та візуалізації: ggplot2, tidyverse, outliers, reshape, gridExtra, ggforce, dunn.test, extraoperators, corrplot.

Для перевірки нормальності розподілу чисельних даних використовувався тест Шапіро-Уїлка (Shapiro-Wilk test), на основі результатів якого робився вибір методу для подальшого порівняння чи аналізу груп чисельних даних. Для попарного порівняння чисельних даних використовувався або t-критерій Ст'юдента (Student's t), або W-критерій Манна-Уїтні-Уїлкоксона (Mann-Whitney-Wilcoxon). Для порівняння кількості груп >2 використовувалися дисперсійні тести – параметричний дисперсійний аналіз (ANOVA) для

нормально розподілених даних або ранговий дисперсійний тест Краскела-Уоліса (Kruskal-Wallis test) для інших розподілів. Для виявлення значущих відмінностей між групами на основі моделей дисперсійних тестів застосовувався post-hoc тест Т'юкі (Tukey's HSD) або тест Дана (Dunn's test). Кореляція між наборами чисельних даних обчислювалася за допомогою коефіцієнтів Пірсона (Pearson's r) або Спірмена (ранговий, Spearman's ρ). Наявність значущих викидів перевірялася за допомогою тесту Грубса (Grubbs' test). Гомоскедастичність (однорідність дисперсій; вимога деяких інших статистичних тестів) перевірялася за допомогою тесту Левена (Levene's test).

Розподіли якісних та дискретних даних порівнювалися за допомогою критерію χ^2 Пірсона – або точного критерія Фішера (Fisher's exact test), якщо доводилося мати справу з невеликими (<10) групами об'єктів.

Для аналізу вкладу змінних у міжгрупову дисперсію застосовувався дискримінантний аналіз, а для візуалізації – канонічний аналіз. Для аналізу розподілу об'єктів за набором параметрів застосовувався аналіз головних компонент (PCA).

Статистично значущими результати тестів визнавалися при $p \leq 0.05$. В якості поправки критичного рівня значущості для множинних порівнянь використовувалася поправка Холма-Бонфероні (як помірно-консервативна).

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ГПС ЗЕЛЕНИХ ЖАБ В УКРАЇНІ

Склад унікальної геміклональної популяційної системи R-Erf типу в нижній течії Сіверського Донця (в с. Брусівка Донецької області та м. Кременна Луганської області) описаний у пункті 5.3, присвяченому детальному дослідженню функціонування ГПС цього типу.

3.1. Західна Україна

3.1.1. Львівщина

ГПС зелених жаб Львівської області були досліджені на основі двох вибірок, зібраних 06 травня 2019 року методом ручного лову.

Вибірка із заплавних озерах (одне з них розширене штучно) річки Кам'янка (с. Жовтанці; 49.996, 24.210) складалася з 42 особин: 21 самиця, 18 самців і 3 нестатевозрілих особини. Середній розмір самиць склав 78.5 мм, середній розмір самців – 80.6 мм; нестатевозрілі особини мали розмір 41.1-48.2 мм.

Морфологічно як *P. esculentus* були визначені 3 дорослі жаби – 2 самиці і 1 самець. Інші жаби були морфологічно визначені як *P. ridibundus*. Однак, 3 жаби, попередньо визначені як озерні (2 самиці і нестатевозріла особина), мали розмір еритроцитів, що перевищував 26 мкм (27.6, 27.2, 26.6 мкм).

Вибірка з ГПС зелених жаб, що населяє обвідний канал Добротвірської ТЕЦ (с. Перекалки; 50.182, 24.388), складалася з 24 особин: 14 самиць, 10 самців. Середній розмір самиць склав 74.5 мм, самців – 68.5 мм.

Морфологічно як *P. esculentus* була визначена 1 жаба (самець). Інші жаби були морфологічно визначені як *P. ridibundus*. Але розмір еритроцитів, що перевищував 26 мкм, було зафіксовано ще у 5 жаб, попередньо визначених як озерні (2 самиць і 1 самця).

Одержані морфологічні дані вказують на те, що обидві досліджені ГПС належать до R-E типу, тобто складаються з озерних жаб та гібридів без ставкових жаб. Однак, отримані дані щодо довжини еритроцитів вказують на вірогідну триплоїдність жаб з великими еритроцитами, тобто на їхню належність до виду *P. esculentus*. Варто відзначити, що поліплоїдія нестатевозрілої особини є менш ймовірною, оскільки діапазон розмірів еритроцитів для молодих особин часто перевищує такий у дорослих. Оскільки потенційні триплоїди були морфологічно близькими до озерних жаб, не виключено, що всі вони мали генотип LRR. Надійно підтвердити наявність триплоїдних гібридів у цих системах (всіма доступними методами) заплановано у якості наступних кроків; їхня присутність була обґрунтована також попередніми молекулярними дослідженнями (Strus, Strus, і Khamar 2023), що також встановили присутність *P. lessonae* в ГПС Жовтанців у вибірках 2011-2015 років. Голосова активність зелених жаб була низькою, тому уточнити склад за акустичними даними не було можливості.

3.1.2. Чернівці

ГПС Чернівецької області були досліджені на прикладі трьох локалітетів: ландшафтних заказників «Гарячий Урбан» (в межах міста Чернівці) та «Цецино» (окраїна міста Чернівці), а також риборозплідних ставків, створених на річці Совиця в околицях села Шипинці. До цього спеціальних досліджень ГПС цієї території не проводилося, лише загальне якісне вивчення батрахофауни (Хлус і Скільський 2006; Смирнов 2007; Н. А. Смирнов і Скільський 2010; Скільський, Смирнов, і Мелешук 2015)

Ландшафтний заказник «Гарячий Урбан» являє собою буковий-дубовий нагірний ліс (48.303, 25.976), що безпосередньо примикає до правобережної приуслової частини річки Прут. Природні умови лісового масиву представляють собою сприятливі умови для розмноження *P. lessonae* завдяки множинним мілким тимчасовим водоймам у балках (Смирнов 2014). Однак, на момент дослідження цього локалітету (04.08.2023), всі водойми пересохли,

позбавивши ставкову жабу типової стації перебування – жодної особини виявити не вдалося.

В прирусловій ділянці і руслі річки Прут (48.305, 25.984) серед дорослих жаб вдалося виявити виключно численних представників *P. ridibundus* (68.2 мм – середня довжина пійманих). Молоді особини (28.1 та 24.5 мм) демонстрували певні ознаки, властиві гібридам (пункт 2.4), але без молекулярного аналізу впевнено стверджувати їхню видову належність нема підстав.

Ландшафтний заказник «Цецино» представляв собою схожий локалітет: буковий нагірний ліс, в ярах якого протікають струмки, що впадають в правобережну долину річки Прут (48.303, 25.841), і в якому містяться тимчасові водойми, що пересохли на момент дослідження (06.08.2023). З комплексу видів зелених жаб вдалося зареєструвати лише 1 молоду (26.8 мм) особину вірогідно *P. ridibundus*, яка ймовірно мігрувала від долини річки.

Річка Совиця є лівою притокою річки Ишків, лівої притоки Прута. Риборозплідні ставки впритул примикають до її русла та обширних плавнів, зарослих очеретом та осокою, а також мають обвідні канали. На момент дослідження (05.08.2023) суттєво зарослі канали та узбережжя не дозволили оцінити склад дорослих жаб популяційної системи ставка.

Але дослідження припало на період, коли в околицях ставка (48.388, 25.717) спостерігалася значна активність молоді зелених жаб окрім водойми (переважно обвідного каналу ставка) також і на суходолі, в трав'янистому покриві автомобільної колії. Була зібрана вибірка з 35 цьогорічок (27.2 мм в середньому), стать яких не була визначена по причині недорозвиненості морфологічних ознак

Морфологічне визначення молодих зелених жаб ускладнене. Втім, наявне серед вибірки морфологічне різноманіття (переважно за забарвленням спинної частини тулуба) дозволяє припустити, що серед цієї молоді вірогідно були присутні особини обох батьківських видів та гібридів. Згідно з цією гіпотезою

риборозвідні ставки мають бути заселені популяційною системою L-E-R типу. Зразки, зібрані нижче за течією (в заплаві річки Ишків, в 2 км прямої відстані) в 2020 році в рамках дослідження мікотичного патогена амфібій (*Batrachochytrium dendrobatidis*) і ідентифіковані молекулярними методами в Ягеллонському Університеті, підтверджують наявність всіх трьох видів в цьому регіоні; також ці результати навіть дають підстави очікувати наявність триплоїдів у L-E-R системі. Дослідити цю систему специфічно на предмет наявності триплоїдних гібридів (всіма доступними методами) заплановано у якості наступних кроків.

3.2. Річка Дніпро

3.2.1. Острів Хортиця

В межах Запорізької області фауна зелених жаб була обстежена лише на о. Хортиця (м. Запоріжжя), а саме на західному (район Туристичного пляжу; 47.828, 35.062) і східному (скельні береги) узбережжях та частині плавнів на півдні острова (47.795, 35.124) 06-08.08.2020.

В ході денних і нічних спостережень та відлову в районах берегової лінії та заплавної озера були виявлені представники лише батьківського виду *P. ridibundus* та численні пуголки зелених жаб, видову приналежність яких встановити в польових умовах неможливо (вірогідно, теж *P. ridibundus*). Жодного гібрида зареєстровано не було.

Отримані дані дають змогу заключити, що геміклональних популяційних систем на о. Хортиця нема. Регіон знаходиться південніше за відому межу ареалу ставкової жаби *P. lessonae* (Pysanets 2014), тож відсутність цього виду була очікуваною.

3.2.2. Пониззя Дніпра

Територія Чорноморського біосферного заповідника НАН України була досліджена на предмет фауни зелених жаб впродовж 31.08-06.09.2020 року, а саме ділянка Івано-Рибальчанська, ділянка Соленоозерна та узбережжя Дніпро-Бузького лиману в її околицях (с. Бузова).

Озера на території Івано-Рибальчанської ділянки (46.454, 32.198) на момент дослідження пересохли, включаючи солонowodне о. Оджигаль (46.431, 32.224). Жодної зеленої жаби на ділянці не зареєстровано.

Озера на території Соленоозерної ділянки (46.454, 31.991), не сполучені з Ягорлицькою затокою на момент дослідження пересохли. Жодної зеленої жаби на ділянці не зареєстровано.

Однак, на узбережжі Дніпро-Бузького лиману, що являє собою обширні очеретяні плавні (46.486, 32.022), 03.09.2020 було добуто вибірку з 8 особин зелених жаб. Усі визначені морфологічно як *P. ridibundus*. Для трьох з них пізніше видова приналежність була підтверджена молекулярними методами у співпраці з Ягелонським Університетом в рамках проекту з дослідження патогенного для амфібій гриба.

Також 06.08.2020 була обстежена ділянка на руслі річки Конка (рукав Дніпра) в м. Гола Пристань.

Була піймана вибірка з 14 особин – 7 самиць, 4 самця і 3 нестатевозрілі особини. Середній розмір самиць становив 65.2 мм, самців – 76.2 мм, нестатевозрілих особин – 40.8 мм.

Серед дорослих жаб 6 були визначені як *P. esculentus* (3 самиці і 3 самця), 5 як *P. ridibundus* (4 самиці і 1 самець). Надійно визначити малих нестатевозрілих особин не можна, але 1 особина демонструвала виражені зовнішньо-морфологічні ознаки *P. esculentus*.

Довжина еритроцитів у дослідженої вибірки становила в середньому 22.77 мкм (21.15-24.08 мкм). Але у однієї особини (морфологічно *P. esculentus*) були зареєстровані еритроцити довжиною 27.15 мкм, що потенційно може свідчити про триплоїдію даної жаби (наступна у ранжованому ряді мала еритроцити

довжиною 24.08 мкм). Частина жаб була проаналізована у Ягелонському Університеті в рамках проекту по вивченню патогенного гриба амфібій: результати непрямо свідчать про вірогідну присутність триплоїдів серед дослідженої вибірки. Якщо триплоїдія серед гібридів в даному локалітеті підтвердиться молекулярними методами, це буде першою зареєстрованою ГПС на півдні України з триплоїдами у складі.

Також окремо були обстежені прісні і солоноводні водойми НПП «Джарилгацький» (о. Джарилгач, Херсонська область). Жодної зеленої жаби не виявлено.

3.3. Лівобережні притоки Дніпра

3.3.1. НПП «Пирятинський»

Національний природний парк «Пирятинський» включає в себе басейн річки Удай в околицях міста Пирятин (Полтавська область), включаючи крупні праві притоки Удая: Перевод, Руда, – і обширну рівнинну заплаву. Удай, в свою чергу, є правою притокою річки Сула, що сама є лівою притокою Дніпра.

В літописах національного парку в списках батрахофауни наводяться всі три українські види зелених жаб – *P. ridibundus*, *P. lessonae* та *P. esculentus*. Однак, наприклад, останнє дослідження 2014 року наводить присутність озерних жаб у парку лише за літературними даними, а відповідні матеріали конференції (Некрасова & Миленко) наводять інформацію про лише один виявлений локалітет. Літопис містить також окремі дані про наявність гібридів та ставкових жаб в районі заказника «Великокручанський».

Колекція Музею природи ХНУ імені В.Н. Каразіна містить також зразки, зібрані Коршуновим О.В. у 2015 та 2017 роках на руслі річки Удай нижче за течією від парку. В рамках роботи Лабораторії популяційної екології амфібій автор працював також із живими тваринами з цих зборів: обидві вибірки

містили жаб, морфологічно визначених як *P. lessonae* та *P. esculentus*. Молекулярні методи в рамках дослідження гриба-патогена амфібій у співробітництві з Ягеллонським Університетом підтвердили наявність обох видів у вибірці 2017 року.

Спеціальних досліджень щодо складу і розповсюдження ГПС зелених жаб в парку не проводилося.

Експедиція територією парку була проведена 28-31.08.2023. Дослідження охоплювали наступні локалітети:

- ботанічна пам'ятка природи «Лісопарк 'Острів Масальський'» – русло річки Удай в м. Пирятин (50.238, 32.530);
- загальнозоологічний заказник «Лесяківський» – русло річки Удай біля с. Лесяки (50.335, 32.495);
- околиці гідрологічного заказника «Сасинівський» – русло річки Перевод біля с. Сасинівка (50.299, 32.407);
- русло річки Руда біля с. Сасинівка (50.313, 32.424);
- ставки і заплавні озера в околицях с. Харківці та с. Дейманівка (50.263, 32.604);
- русло річки Удай в околицях с. Дейманівка (50.203, 32.635).

Біотопи «Острова Масальського» включають в себе ділянку, що підвищується над лівобережною заплавою р. Удай і поросла дібровою. Зелені жаби, таким чином населяють лише вузьку прируслову ділянку між річкою і лісом (на цьому березі). В лісопарку було піймано 4 дорослі зелені жаби двох видів: *P. lessonae* та *P. esculentus*; два гібриди були самцями, а дві ставкові жаби – самицями. Ще кілька особин *P. lessonae* спостерігались, але не були піймані.

На руслі р. Удай в межах заказнику «Лесяківський», на піщаному пляжі з порівняно неглибоким (до ~1.5 м) зарослим прибережжям, було зібрано 8 особин зелених жаб, 4 дорослих і 4 ювенільних. Всі дорослі виявились самицями та належали виду *P. ridibundus*. Ювенільні особини були

невизначеної статі та мали зовнішню морфологію, подібну на таку у *P. ridibundus* – вірогідно, до цього виду й належали. Ще кілька дорослих і молодих особин *P. ridibundus* спостерігались в тій же точці, але не були піймані.

Дві ділянки – русло р. Перевод та русло р. Руда, – виявилися схожими за екологічними параметрами: мілкі (до ~1.5 м), неширокі та холодні річки з мало зарослим прибережжям та рівнинними берегами. Сумарно на них було зібрано 20 особин зелених жаб, з яких 5 дорослих (3 самиці та 2 самця), 3 ювенільних особини та 10 пуголовків на різних стадіях розвитку (1 з них метаморф). Усі дорослі належали до виду *P. ridibundus*, усі ювеніли мали зовнішньо-морфологічні ознаки того ж виду; вид пуголовків в польових умовах встановити неможливо. Ще кілька дорослих і молодих особин *P. ridibundus* спостерігались в тих же точках, але не були піймані.

Ділянка русла річки Удай в околицях села Дейманівка представляла собою піщаний пляж на правому березі з густо зарослим вищою водною рослинністю прибережжям. На ділянці було зібрано 9 особин зелених жаб, з яких: 5 особин *P. lessonae* (1 самиця і 4 самці), 2 особини *P. esculentus* (1 самиця і 1 самець) та 2 ювенільні особини, одна з яких мала морфологічні ознаки *P. lessonae*, а інша *P. ridibundus*.

Водойми заплави Удай в околицях с. Дейманівка та с. Харківці включали в себе ставок Гайки, великий став Каплинці та низку заплавлених озер (Конопляне, Харитонове та ін.). На узбережжі великого ставу Каплинці жаб не було виявлено. У інших водоймах сумарно було спіймано 9 особин, з яких: 1 особина *P. lessonae* (самець), 4 *P. esculentus* (самиця та 3 самця), 2 цьогорічки та 2 пуголовка-метаморфа.

Отримані дані свідчать про присутність на території НПП «Пирятинського» всіх трьох українських видів зелених жаб, чим підтверджуються попередні дані (Некрасова і Миленко 2016). Однак, нові дані свідчать радше про масовість виду *P. ridibundus* на території парку, але лише у верхній течії річки

Удай (в межах парку) та правобережних притоках (Перевод, Руда). Види *P. lessonae* та *P. esculentus* розповсюджені вздовж всієї течії річки Удай (в межах парку): відсутність цих видів у вибірці з заказнику «Леляківський» може свідчити про випадковість (персональне повідомлення к.б.н., герпетолога Коршунова О.В. свідчить про зустріч цього виду в цій ділянці в попередні роки). На руслі було зафіксовано популяційну систему L-E-R типу. Популяційні системи L-E типу, вочевидь, населяють невеликі ставки та озера в околицях річки Удай.

3.3.2. РЛП «Сеймський»

Регіональний ландшафтний парк «Сеймський» охоплює територію Посейм'я, а саме долину річки Сейм (по якій проходить приблизна межа лісової та лісостепової природних зон) з долинами його приток між містами Путивль, Кролевець та Конотоп.

Окремих досліджень щодо наявності та складу ГПС на території парку не проводилося. Літературні дані свідчать лише про охоплення цієї території ареалами всіх трьох видів зелених жаб України (Pusanets 2014).

Територія дослідження в межах парку включала в себе:

- став на річці Стрижень у селі Воргол – узбережжя, заболочені верхів'я, околиці з заплавленим лісом та вільшаниками (51.441, 33.700);
- русло річки Клевень у селі Литвиновичі (51.408, 33.677);
- русло річки Сейм в районі впадіння р. Клевень в селі Камінь (51.400, 33.584);
- озера заплави річки Сейм в околицях села Спаське (51.399, 33.311).

Також частина матеріалу була зібрана у штучній водоймі на території приватного господарства в селі Воргол, в безпосередній близькості до ставка на річці Стрижень.

На ділянці впадіння річки Клевень у річку Сейм, в прирусловій ділянці було піймано 8 особин зелених жаб, з яких: 4 самиці, 2 самця та 2 нестатевозрілі

особини. Морфологічні ознаки вказували на приналежність всіх особин до виду *P. ridibundus*. Багато озерних жаб також фіксувалося візуально вздовж русла; інші види помічені не були.

Заплавні, вочевидь старичні, озера долини річки Сейм також виявилися заселеними виключно представниками *P. ridibundus*. Була піймана лише 1 самиця, але ряд інших особин спостерігалися візуально.

Річка Клевень в районі с. Литвиновичі мала дуже повільну течію внаслідок розташування дамби прямо біля села. Внаслідок цього прямо у прибережній ділянці русла були створені сприятливі умови для розвитку молодняка: масово, у кількостях та щільності, що не піддавалися обліку, спостерігалися пуголовки та метаморфи на дуже різних етапах розвитку, а також нещодавно пройшовші метаморфоз цьогорічки – для зелених жаб такого віку вид визначати не представляється надійним. Однак, дещо нижче за течією (200 м) в районі дамби були спостережені та піймані дорослі жаби лише виду *P. ridibundus* (5 самиць).

Проте на штучному ставку на р. Стрижень в межах с. Воргол картина виявилася набагато яскравішою. У ставку спостерігалися та були піймані всі три види українських зелених жаб, але вони були розподілені біотопічно. Представники *P. ridibundus* були піймані як на болотистих, з трясовиною, верхів'ях ставка (2 самиці), так і на відкритій воді серед заростей очерету і рогозу (1 самець). Представники *P. lessonae* (3 самиці, 3 самця) були відловлені виключно на болотистих верхів'ях ставка. Єдиний представник *P. esculentus* був зібраний у безпосередніх околицях ставка, у маленькій штучній водоймі на території приватної садиби (1 самець).

Цей є єдиний представник гібридів безсумнівно походить зі ставка (оскільки у найближчому оточенні від садиби нема жодних інших водойм) і підтверджує існування в ній L-E-R системи, що різко контрастує з чистими популяціями озерної жаби на руслах найближчих річок. Приватні

повідомлення від власника садиби (після експедиції автора) додатково підтверджують існування там гібридів (з фотографіями тварин).

Результати дослідження свідчать про існування у Посейм'ї складних геміклональних популяційних систем L-E-R типу, які, втім, вірогідно, зосереджені обабіч великих водотоків, у штучних ставках та невеликих річках.

3.3.3. Вакалівщина

Басейн річки Псел був досліджений в околицях біологічного стаціонару Сумського державного педагогічного університету імені А.С.Макаренка «Вакалівщина», що розташований біля села Вакалівщина і заказника «Джерело Вакалівське» впродовж 13-17.07.2020.

Ця територія раніше не вивчалась з точки зору складу і розповсюдженості ГПС зелених жаб. Однак, більш ранні популяційні системи басейну річки Псел вивчались вище і нижче за течією: в Курській області росії та в Гадячському районі Полтавської області (Lada et al. 2011). Результати показали наявність всіх трьох видів в басейні р. Псел та відсутність триплоїдів (хоча плідність була встановлена для 37 жаб сумарно з усіх точок збору).

Локалітети, включені в дане дослідження включали в себе:

- ставок на річці Битиця і русло річки в околицях села (51.027, 34.929);
- русло і залив річки Псел в околицях впадіння в нього річки Битиця біля села Битиця (50.982, 34.940);
- ставок на річці Олешня в селі Кияниця (51.071, 34.901).

В штучному ставку на річці Битиця в с. Вакалівщина, призначений для рибного господарства та рибалки, не було виявлено жодної зеленої жаби. Опосередкованих ознак, як-от вокалізації, також не було зареєстровано, не дивлячись на сезон активності для зелених жаб.

В штучних водоймах (копанках) на руслі р. Битиця жодної жаби здобуто не було, хоча вони масово спостерігались. Вид для більшості встановити не вдалося, хоча були зареєстровані особини *P. esculentus*.

Штучний ставок на р. Олешня в с. Кияниця жаб виявити не вдалося – вірогідно, через дощову погоду, що трималася впродовж пари днів. За свідченнями місцевих жителів, зелені жаби населяють даний ставок і нерестяться в ньому (повідомлялося про потужну вокалізацію). З огляду на біотоп – великий рибальський ставок, – вірогідно існування в ньому як мінімум виду *P. ridibundus*.

На руслі та затоках річки Псел у околицях с. Битиця (від пляжу вище і до заливу нижче впадіння річки Битиця; ~ 1.3 км) було здобуто 14 особин зеленої жаби, що морфологічно були визначені як: 5 особин *P. ridibundus* (4 самиці та 1 самець), 6 особин *P. esculentus* (3 самиці та 3 самця), 1 самиця виду *P. lessonae* та 2 ювеніла, за морфологією більше подібні до *P. ridibundus*. Варто зазначити, що саме в цій вибірці була присутня гібридна самиця, що не мала дорзомедіальної смуги – стан, нехарактерний для носіїв L-геному, який, як вважається, має домінуючий алель гену цієї ознаки. Не дивлячись на малий розмір вибірки, чисельність і щільність жаб на дослідженій ділянці була дуже високою (до 10 жаб на 1 м берега), включаючи гібридів і (вірогідно) особин ставкової жаби в таких нехарактерних для них біотопах як прибережжя правого берега швидкої широкої річки. Особливо висока щільність і присутність як всіх трьох видів (ставкова жаба була піймана саме там), так і великої кількості (до кількох десятків на 1 м² прибережжя) молодих цьогорічок спостерігалася у заливі.

Середній розмір дорослих статевозрілих жаб склав 53.97 мм, ювенільні особини мали розмір 3.59 та 3.81 мм. Середній розмір еритроцитів для всієї вибірки склав 23.41 мкм (21.79-25.93). Розміри еритроцитів не дають підстав підозрювати триплоїдію навіть у гібридної жаби з найбільшими еритроцитами.

Результати свідчать про існування в цій ділянці долини ріки Псел L-E-R системи зі значною часткою гібридів у складі, що населяє русло річки і найближчі заливи. Згідно з ранішими дослідженнями (Lada et al. 2011), русло

Псла дещо ненабагато вище за течією (с. Гирья) спостерігається картина з «порівняними частками всіх трьох видів» (причому в заливах гібридів менше), ще вище за течією чисельність *P. lessonae* знижується, як і складність систем (більше стає R-E). А ось суттєво нижче за течією (на півночі Полтавської області) – R-E-L системи зберігаються і вздовж русла, і вище за течією правих приток (с. Сватки, р. Грунь). Останнє дає обережні підстави вважати, що ставок на р. Олешня (с. Кияниця) може також бути населеним складною L-E-R системою, хоча і знаходиться високо по течії притоки від Псла та за пагорбистим водорозділом.

Ці ж дані дозволяють стверджувати з великою впевненістю про присутність R-E-L систем і ближче до Сум, доповнюючи наведену у статті інформацію лише щодо наявності там *P. ridibundus* (по музейним даним).

Дані щодо довжини еритроцитів, як і проточна ДНК-цитометрія (Lada et al. 2011) не дають підстав підозрювати поліплоїдію у гібридів басейну Псла. Однак, і еритроцити і вміст ДНК був виміряний на невеликих кількостях (14 та 37), що нерепрезентативно представляє великий, довгий ареал *P. esculentus* в межах басейну Псла.

Непрямі докази свідчать про те, що долина Псла в нижній течії (біля впадіння в Дніпро, біля Кременчука) знову виявляється заселеною переважно *P. ridibundus* (персональне повідомлення).

3.3.4. НПП «Слобожанський»

Територія національного природного парка «Слобожанський» включає в себе прируслові та заплавні ділянки, а також об'єднану болотисту піщану терасу річок Мерла та Мерчик (її ліва притока), разом з дібровами, луками та ярами (зі ставками) на правих берегах обох річок (50.061, 35.235).

Було відомо, що територію парка населяють всі три українські види зелених жаб: *P. ridibundus*, *P. esculentus* та *P. lessonae*. Більшість зустрічей ставкової жаби припадали саме на комплекс боліт на боровій терасі, а отже саме там

існують L-E системи та можливе утворення найскладніших L-E-R систем в біотопах, близько розташованих до русла річок.

Дослідження 2021 та 2023 років підтвердили наявність всіх трьох видів на модельних болотах поблизу с. Сорокове. У вибірці 2023 року були присутні 8 самців, 2 самиці та 3 ювеніли. Принаймні 2 самиці морфологічно відносяться до *P. lessonae*, видова належність самців потребує уточнення молекулярними методами через морфологію місцевих гібридів, дуже близьку на таку у ставкових жаб. Безперечна наявність самців *P. ridibundus* та *P. lessonae* була засвідчена польовими спостереженнями 2021 року (включаючи реєстрацію шлюбної пісні). Наявність самиць *P. esculentus* була засвідчена польовими спостереженнями 2021 року (1 самиця).

Проміри еритроцитів вибірки 2023 року продемонстрували наявність двох особин з еритроцитами 29.8 мкм (Рис. 3.5). Одна з цих особин є ювенілом (38 мм) з морфологією, що свідчить про гібрида або ставкову жабу; ствердження щодо плідності в її випадку має бути до певної міри обережним. Друга особина морфологічно визначена як *P. lessonae*; втім, довжина еритроцитів свідчить про триплоїдію – з огляду на морфологію, можна припустити генотип LLR (Kierzkowski et al. 2013). Наявність триплоїдів у Слобожанському НПП свідчило б про існування набагато більш складних (L-E-Ep-R) систем на Харківщині і в Україні в цілому, ніж передбачалося раніше. Каріологічні та молекулярні методи заплановані в якості наступних кроків вивчення.

3.4. Чорнобильська Зона відчуження

Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник займає територію Зони відчуження, що була організована на місцевості, яка постраждала та була забруднена радіоактивними матеріалами після катастрофи на Чорнобильській атомній електростанції (ЧАЕС) 26.04.1986. Будь-яка промислова та сільськогосподарська діяльність тут була припинена,

а отже екосистеми на території Зони опинилися в стані раптового суттєвого зниження антропогенного тиску – що надає виключну можливість для біологічних досліджень різного профілю (Videvall, Burraco, і Orizaola 2022). При цьому радіаційне забруднення продовжувало впливати на них непередбачуваним чином – в тому числі і на амфібій, включно з популяціями зелених жаб (Gashchak et al. 2009; Videvall, Burraco, і Orizaola 2022). Варто відмітити, що для деяких видів було показано цілком успішне проживання і процвітання на контамінованих територіях (Burraco, Car, et al. 2021; Burraco, Bonzom, et al. 2021). Для певних груп амфібій – зокрема для східної райки, *Hyla orientalis* Bedriaga, 1890, – був показаний зв'язок особливостей забарвлення із радіаційною забрудненістю території, а отже і можливий вплив останньої, але без помітних негативних наслідків для популяції в цілому (Car et al. 2022; Burraco і Orizaola 2022).

Зелені жаби з території Зони відчуження були досліджені слабо. Для гібридних та їстівних жаб з території Зони не було виявлено значущих відмінностей у коефіцієнті варіації вмісту ДНК в клітинах (Розанов, Виноградов, і Боркин 1990), хоча з території, забрудненої радіонуклідами поза Зоною (Брянська область, Білорусь) такі порушення були зареєстровані (Vinogradov і Chubinishvili 1999). Паралельно були дані щодо унікальних на той час порушень сперматогенезу у самців *P. esculentus* з Чорнобильської Зони (Виноградов, Розанов, і Боркин 1990). В новітній час окремі нечисленні дані щодо присутності видів на території заповідника були отримані Олексієм Марущаком (Марущака 2022). Жодних системних досліджень складу і поширення різних типів геміклональних популяційних систем на території Зони не проводилося.

Експедиція з метою дослідження на предмет наявності і складу геміклональних популяційних систем зелених жаб в Чорнобильському радіаційно-екологічному біосферному заповіднику була здійснена в період 09-

12.08.2021 (Mykola Drohvalenko i Fedorova 2022). Були відвідані та досліджені наступні локалітети (Рис. 3.1):

- обвідний канал ставка-охолоджувача ЧАЕС – неглибокий (до 1.5 м) канал зі стоячою водою, порослий ряскою, куширем та різаком, з берегом, вимощеним плитами (51.397, 30.140);
- русло річки Прип'ять в межах міста Чорнобиль – гальково-піщаний берег великої річки (51.274, 30.242);
- стариці та заплавні озера лівого берега річки Прип'ять – стоячі водойми різного розміру у піщаній заплаві поблизу русла річки, навпроти ставка-охолоджувача ЧАЕС (51.335, 30.204);
- русло ділянки річки Уж – вузька та мілка ділянка річки зі швидкою течією біля порогів (51.271, 29.760);
- стариці та заплавні озера лівого берега річки Уж – стоячі водойми різного розміру у піщаній заплаві поблизу русла річки неподалік від її впадіння у р. Прип'ять (51.256, 30.222);
- старі меліоративні канали, що належать долині річки Уж – густо зарослі канали з трясовиною і старими бобровими загатами (51.239, 30.171);
- старі меліоративні канали, що належать річці Ілля – ділянка великих, хоча й обмілілих, зашлюзованих каналів біля їхнього впадіння в русло річки, також густо зарослі тілорізом та ін. (51.256, 29.839).

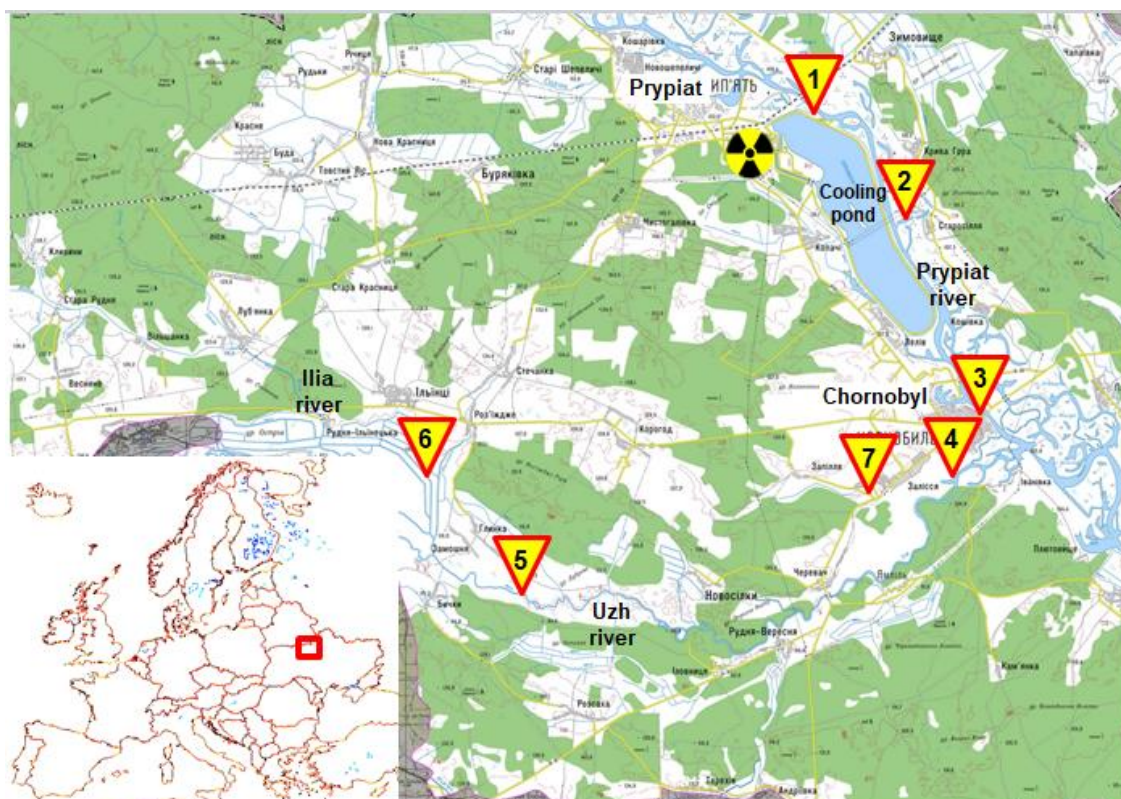


Рисунок 3.1. Досліджені локалітети в Зоні Відчуження: 1) обвідний канал, 2) заплава Прип'яті 3) русло Прип'яті, 4) заплава Ужа, 5) русло Ужа, 6) канали і русло Іллі, 7) канали долини Ужа (з Drohvalenko і Fedorova (2022) зі змінами)

У ході дослідження була добута 52 особина зелених жаб, з яких: 1 пуголовок старшого віку, 32 нестатевозрілі особини, 10 самиць та 9 самців: 31 особина була добута у обвідному каналі ставка-охолоджувача, 12 особин (включаючи пуголовка) добуто у меліоративному каналі річки Ілля, 5 особин на руслі річки Прип'ять в межах міста Чорнобиль, 1 особина на руслі та 1 в заплаві річки Уж, 1 особина в старих меліоративних каналах долини річки Уж, 1 особина в заплаві річки Прип'ять.

Усі жаби, піймані на руслі р. Прип'ять (3 самиці, 2 самці), були визначені морфологічно як *P. ridibundus*; мали диплоїдний розмір еритроцитів (20.21-22.25 мкм). Жаба, піймана в заплаві р. Прип'ять (самиця), була визначена морфологічно як *P. esculentus*; мала потенційно триплоїдний розмір еритроцитів (26.67 мкм).

Жаба (нестатевозріла особина), піймана на руслі р. Уж, була визначена морфологічно як *P. ridibundus*; препарат крові не вдався. Жаба (самиця), піймана в заплаві р. Уж, була визначена морфологічно як *P. ridibundus*; мала диплоїдний розмір еритроцитів (21.53 мкм). Жаба, піймана в меліоративному каналі долини р. Уж (самець), була визначена морфологічно як *P. esculentus*; мала диплоїдний розмір еритроцитів (21.22 мкм).

З 12 особин, пійманих у меліоративному каналі р. Ілля: 1 самець був морфологічно визначений як *P. lessonae* (еритроцити диплоїдні, 21.68 мкм) та 1 самець як *P. esculentus* (еритроцити диплоїдні, 19.37 мкм); 9 нестатевозрілих особин мали диплоїдні еритроцити (19.93-23.33 мкм); кров у пуголівка (стадія розвитку 35-40) не бралася та вид не визначався.

З 31 особини, пійманої в обвідному каналі ставка-охолоджувача: 6 статевозрілих особин (2 самиці, 4 самця) були морфологічно визначені як *P. esculentus*, причому у частини були диплоїдні еритроцити (21.56-22.47 мкм), а у 1 самця потенційно триплоїдні (27.03 мкм); 3 самиці були морфологічно визначені як *P. lessonae* (еритроцити диплоїдні, 21.91-23.08 мкм); 22 нестатевозрілі особини мали різноманітну морфологію, причому частина мала диплоїдні еритроцити (18.80-22.64 мкм), а 2 особини – потенційно триплоїдні (26.10 та 27.75 мкм).

Окрім особин, відловлених та проаналізованих, присутність деяких форм зелених жаб також була зареєстрована акустично і візуально. Так, в заплаві річки Уж окрім пійманого *P. ridibundus* фіксувались також численні *P. esculentus*, яких не вдалось спіймати. Аналогічно, в заплавних озерах річки Прип'ять візуально були відмічені також *P. ridibundus*. Наявність *P. lessonae* в обвідному каналі була додатково підтверджена зареєстрованою вокалізацією самця.

За розміром еритроцитів дорослі жаби мали очевидну і чітку розмежованість (Рис. 3.2). Втім, для уточнення реального критичного значення довжини еритроцитів потрібне дослідження більшого числа особин.

Нестатевозрілі особини навпаки, являли собою радше континуум розмірів еритроцитів, що перетинає теоретичну межу (26 мкм), а тому їх всіх було розглянуто в якості єдиної групи (Рис. 3.2). Варто зазначити, що для деяких ГПС вже було показано, що розподіл довжин еритроцитів для ювенільних особин більший, ніж для дорослих (Drohvalenko et al. 2021). Також вартий уваги збіг: потенційні триплоїди серед ювенільних особин були знайдені якраз в тій системі (обвідного каналу), де був знайдений також потенційно триплоїдний самець. Ювенільні особини з найменшими еритроцитами (19.79, 19.71 та 18.80 мкм) були метаморфами та ще зберігали маленькі залишки хвоста.

Між дорослими і ювенільними особинами не було значущої різниці в розмірах еритроцитів: ні серед «диплоїдів» ($p=0.354$), ні серед «триплоїдів» ($p = 0.533$).

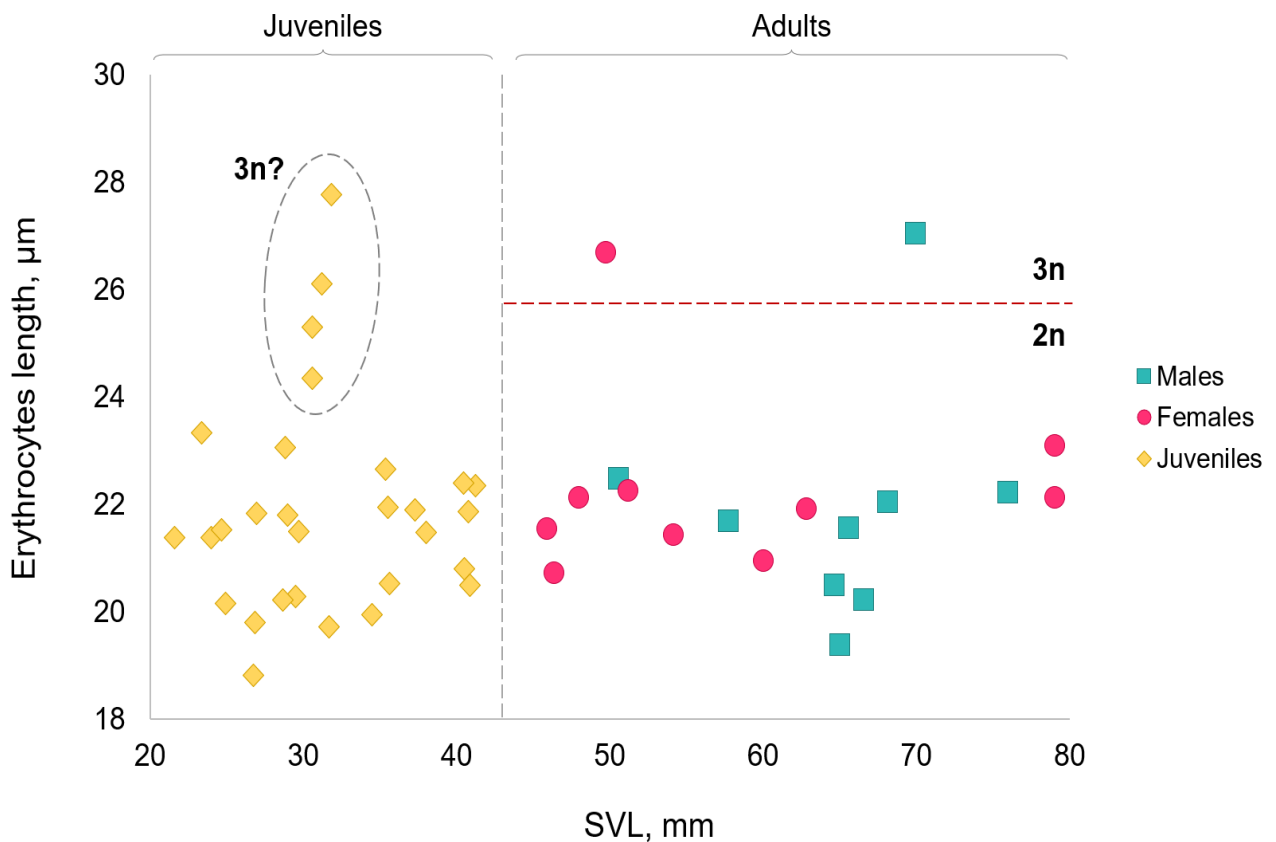


Рисунок 3.2. Розподіл жаб, пійманих в Чорнобильській Зоні відчуження за їхніми середніми довжинами еритроцитів та SVL. Червоний пунктир

позначає ймовірну межу для триплоїдів; пунктирне коло позначає нестатевозрілих особин з неясною плоїдністю (з Drohvalenko і Fedorova (2022) зі змінами).

Отримані та проаналізовані вибірки є недостатньо великими для ґрунтовних та остаточних висновків щодо складу досліджених ГПС, але достатніми для попередніх.

Так, присутність батьківських видів у меліоративних каналах долини р. Уж непрямым чином підтверджується наявністю там гібридної форми, що залежить від них у своєму розмноженні. Екологічні умови локалітету свідчать на користь вірогідної присутності там *P. lessonae* (Pysanets 2014) – а отже, існування там L-E ГПС.

Заплави обох великих річок (Прип'ять та Уж), судячи з усього заселені R-E ГПС, а система з русла та каналів річки Ілля заселена L-E ГПС. Також видається вірогідним участь в розмноженні L-E ГПС обвідного каналу *P. ridibundus*, які цілком здатні мігрувати з русла р. Прип'ять, розташованого на відстані порядку сотні метрів (Wells 2007), утворюючи, таким чином, L-E-R систему (Рис. 3.3).

Локалітет		Відловлено	Спостереження	Імовірний тип ГПС
р. Прип'ять	Заплава	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	R-E(-Ep?)
	Русло	<i>P. ridibundus</i>	-	R
р. Уж	Заплава	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	R-E
	Русло	<i>P. ridibundus</i>	-	R
р. Ілля	Канал (~русло)	<i>P. esculentus</i> / <i>P. lessonae</i>	-	L-E
Меліоративний канал (далеко від водотоків)		<i>P. esculentus</i>	-	(L-)E
Обвідний канал ставка-охолоджувача		<i>P. esculentus</i> / <i>P. lessonae</i>	<i>P. lessonae</i> (спів?)	L-E(-R)(-Ep?)

Рисунок 3.3. Склад ГПС Зони відчуження за результатами досліджень та спостережень (Дрогваленко і Федорова 2022, зі змінами)

Геномний склад триплоїдних гібридів в ГПС Зони ще має бути досліджений. Тим не менш, сама їхня присутність вже робить місцеві системи набагато складнішими, аніж вважалось раніше. Наприклад, ймовірна L-E-R ГПС обвідного каналу в разі підтвердження наявності триплоїдів буде найскладнішою з відомих систем України (наприклад, Meleshko, Korshunov, і Shabanov 2014). Відтворення триплоїдів передбачає також наявність форм, що продукують диплоїдні гамети – наприклад, диплоїдних *P. esculentus* (Biriuk et al. 2016). Такі системи можуть стати новими об'єктами в дослідженні еволюції і популяцій загалом, і геміклональних популяційних систем зокрема за впливу на них іонізуючої радіації.

Попередні дослідження не виявляли ознак триплоїдії серед зелених жаб Чорнобильської Зони. Можливо, через занадто малі проаналізовані вибірки. Або, гіпотетично, через нещодавнє виникнення триплоїдів в досліджених системах – в такому разі роль іонізуючої радіації в цьому процесі ще має бути встановлена.

3.5. Харківщина

На основі власних польових спостережень, збору польового матеріалу та лабораторних досліджень, а також аналізу колекцій лабораторії Популяційної екології амфібій та (вперше складеної автором) бази даних лабораторії за минулі роки (2012-2012) вдалося описати склад нових ГПС та уточнити актуальний склад деяких вже відомих (Коршунов 2010, Korshunov 2008; Шабанов et al. 2017) популяційних систем Харківщини (Рис. 3.4).

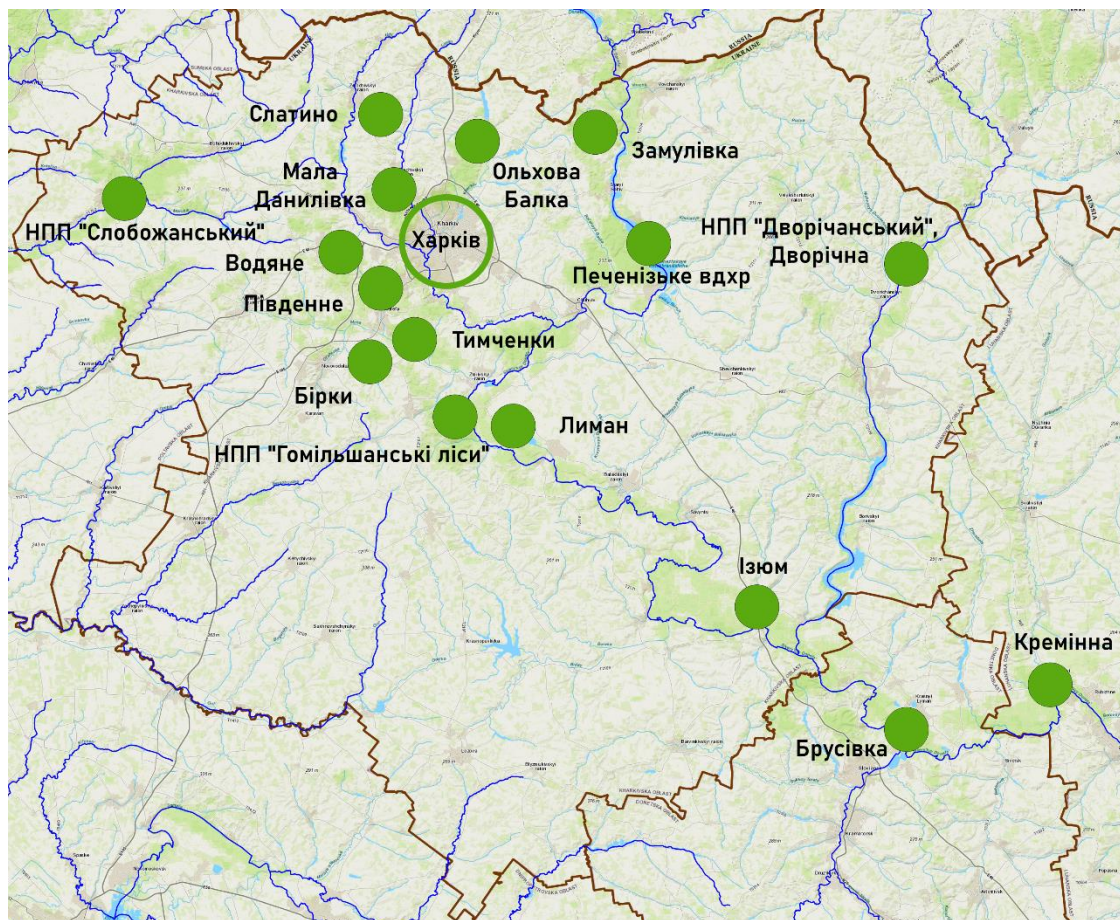


Рисунок 3.4. Локалітети Харківщини і прилеглих частин басейну Сіверського Донця, охоплені дослідженнями

3.5.2. Сіверський Донець

В ставку в с. **Замулівка** (колишнє Жовтневе; 50.134, 36.767) була раніше описана R-E-Ep ГПС унікального складу, що містила *P. ridibundus* і диплоїдних *P. esculentus* обох статей разом з триплоїдними самицями LLR-*P. esculentus* – R-E-Epf ГПС (Meleshko, Korshunov, i Shabanov 2014). Однак,

спеціальна перевірка, здійснена в серпні 2020 року виявила на ставку вкрай низьку чисельність спостережуваних жаб: здобуто було лише 2 особини *P. ridibundus*. Питання існування попередньої складної ГПС лишається відкритим. У околицях, в ставку біля с. Рубіжне, також була виявлена R-E ГПС.

У **Печенізькому водосховищі** (50.093, 36.807) до 2020 року не наводилися дані щодо наявності гібридів (Korshunov 2008), відомих лише з околиць водосховища. Тоді як в 2020 році в ході практики студентів 3-го курсу були зареєстровані гібридні зелені жаби (околиці с. Мартове), що свідчить про експансію гібридів до даної водойми.

Озера периферії великого **озера Лиман** (с. Лиман; 49.575, 36.486), що знаходиться в долині Сіверського Донця, були досліджені впродовж 2018-2021 років. Виявлено наявність в них і *P. ridibundus*, і *P. esculentus*, ймовірно обох статей. Даних щодо плідності гібридів бракує.

Попередні дослідження не наводили даних щодо наявності гібридів серед зелених жаб в межах **міста Ізюм** (Korshunov 2008), або наводили наявність лише озерних жаб у самому місті (Коршунов 2010), а гібридів лише у околицях (Suriadna 2010). В 2018 році, однак, в межах міста (ставок в долині струмка Звіринка; 49.195, 37.262) був зареєстрований 1 вокалізуючий самець *P. esculentus*, а на узбережжі лівого берега річки С. Донець (49.195, 37.295) – нестатевозріла особина *P. esculentus*. Враховуючи реєстрації триплоїдів вище і нижче за течією від м. Ізюм (Коршунов 2010), не виключено існування R-E-Er ГПС і в межах міста.

3.5.3. Ріка Харків

Система з 7 ставків у **балці Ольховій** (50.161, 36.379) між селами Руська Лозова та Борщова, яка впадає у долину річки Харків, була досліджена протягом 2019-2021 років зазвичай у травні-червні. Серед визначених морфологічно видів зустрічалися *P. ridibundus* та *P. esculentus* обох статей. Екологічна особливість: багато зелених жаб (та інших безхвостих амфібій)

зустрічаються тут у антропогенному мікро-ландшафті на дорогах: в калюжах в коліях, утворених вантажним колісним транспортом, – в такому біотопі зустрічалось багато гібридних самиць. Таким чином, тут зареєстрована R-E ГПС. Новітніх даних щодо плідності місцевих гібридів не вистачає.

Водосховище «Журавлівський Гідропарк» (поєднане з гребним каналом; 50.014, 36.299) розташоване на північному сході міста. Багаторічне використання місцевих жаб для експериментальних схрещувань з метою дослідження гаметогенезу різних форм гібридів дозволив встановити, що тут зустрічаються обидві статі *P. ridibundus* та самці *P. esculentus* – самиці гібридів або відсутні, або надзвичайно рідкісні. Вивчення довжин еритроцитів місцевих жаб (Рис. 3.6) показало особин з крупними (25.6 мкм), але не підозрілими еритроцитами. Отже, геміклональна система Гідропарку відноситься до R-E типу. Аналіз потомства від експериментального схрещування ♀ *P. ridibundus* × ♂ *P. esculentus* з Гідропарку продемонструвало амфіспермічність місцевих гібридних самців (див. пункт 5.4).

Система дренажних каналів (50.009, 36.268) в **районі Журавлівка** міста Харкова була досліджена у липні 2023 році. Було зафіксовано масове скупчення *P. ridibundus* обох статей в окремій канаві та поодинокі особини в усій системі, а також 2 самці *P. esculentus* та поодинокі вокалізація самця *P. esculentus*. Ймовірно, місцева система тісно споріднена з системою Гідропарку, що знаходиться неподалік за жвавою автотрасою, і також належить до R-E системи. Даних щодо плідності гібридів не вистачає.

В штучному ставку (район П'ятихатки, м. Харків; 50.086, 36.270) в **балці Очеретянка**, що впадає у долину р. Харків, були виявлені дорослі особини *P. esculentus* та ювеніли, морфологічно схожі на *P. ridibundus* – тож є всі підстави вважати місцеву систему як мінімум R-E типу.

3.5.4. Ріка Лопань

Ставок у яру, що впадає у долину річки Лопань, біля хутору Солоний Яр (на захід від с. Слатине; 50.207, 36.078) був досліджений в липні 2020 року.

Зелені жаби, що населяють його, належать до видів *P. ridibundus* та *P. esculentus*. З останніх були зареєстровані лише самці – але вибірка була недостатня для ґрунтовних висновків. ГПС належить до R-E типу; даних щодо плідності бракує.

Штучний ставок в долині річки Лопань між селами Караван, Зайченки та **Мала Данилівка** був досліджений в липні 2023 року (50.060, 36.140). Спостереження продемонстрували наявність в ставку і *P. ridibundus*, і *P. esculentus*, ймовірно обох статей (як мінімум самки перших і самці других). На мілководних перекатах річки Лопань в околицях цього ставка також були піймані нестатевозрілі особини обох цих видів. ГПС належить до R-E типу.

Багаторічні спостереження ділянки річки Лопань в районі **водосховища «Олексіївський Лугопарк»** (50.038, 36.183) продемонстрували населеність її обома видами (*P. ridibundus* та *P. esculentus*), даних щодо статевого розподілу не вистачає. ГПС належить до R-E типу.

Водосховище на річці Олексіївка (притока Лопані; 50.037, 36.204) **«Олексіївський Гідропарк»** було досліджене в 2023 році. Абсолютно переважаючим видом зелених жаб у водоймі є озерна жаба *P. ridibundus*, зареєстрована у великій кількості і щільності. *P. esculentus* був зареєстрований у вигляді єдиного представника – вокалізуючого самця. Про наявність тут ГПС треба говорити обережно, бо джерело появи єдиної гібридної особини неясне.

Серед зелених жаб річки Саржинка, на якій у **Саржиному яру** був штучно створений ставок Комсомольський (50.036, 36.249), до цього наводилися лише *P. ridibundus*. Однак, в жовтні 2020 року у верхів'ях ставку був зареєстрований ювеніл *P. esculentus*, що вірогідно свідчить про відтворення тут гібридів (ювеніл менш ймовірно мігрував здалеку), а отже і присутність R-E ГПС.

Населення зелених жаб **затопленого кар'єру** (біля вул. Ключківська; 50.026, 36.205), що живиться джерелами та належить до долини р. Лопань, складається лише з озерних жаб *P. ridibundus*. ГПС, таким чином, відсутня.

На руслі Лопані в районі **Мирський Гай** (нижче за впадіння р. Харків, м. Харків; 49.957, 36.220) був виявлений ювеніл *P. esculentus*, що засвідчує відтворення тут гібридів, а отже і присутність R-E ГПС.

У маленьких водоймах, утворених струмками у забудованій долині р. Лопань та р. Сухий Жихор (притока Лопані), в індустріально-транспортній частині району **Левада** (м. Харків; 49.954, 36.238) в 2023 році були зареєстровані два самця *P. esculentus*. Це означає вірогідне існування в цьому районі R-E ГПС (якщо виключити дальню міграцію).

3.5.5. Ріка Уди

Штучний ставок, найвищий і найменший в системі ставків у ярах, що впадають в долину р. Уди, в селищі **Водяне** (м. Люботин; 49.948, 35.960), був досліджений в червні 2023 року. Зареєстрована висока чисельність і щільність жаб (до 10 особин на 1 м берегової лінії). Вибірка з 35 дорослих особин складалася з 33 самців *P. esculentus* та 2 самиць *P. ridibundus*. Інші форми не були візуально спостережені, вокалізації самців озерних жаб зареєстровано не було. Проміри еритроцитів продемонстрували наявність тут однієї жаби з крупними (26.3 мкм), але не надто підозрілими клітинами (Рис. 3.5). Отже, отримані наразі результати демонструють існування тут R-E ГПС.

Район **Удянського водосховища** і його північних заплавних околиць (м. Харків, 49.967, 36.139) був об'єктом спостереження багато років. На ньому переважно спостерігалися *P. ridibundus* та самці *P. esculentus*. ГПС належить до R-E типу. Морфологічно гібриди з цього району дуже близькі до батьківського виду *P. lessonae*, включаючи схожість шлюбної вокалізації самців (персональне повідомлення Шабанова Д.А.).

Урочище «Трикутник» в околицях району Новожанове (м. Харків; 49.952, 36.182) було вперше досліджене автором, в період 2019-2021 років. Його західні околиці включають озера заплави річки Уди та штучні канали. В урочищі також зафіксована висока чисельність (за вокалізаційною активністю і спостереженнями) зелених жаб в нерестовий період (травень-червень) та

наявність і *P. ridibundus*, і *P. esculentus*. Даних щодо статевого розподілу і плоідності бракує. Місцева ГПС очевидно належить до R-E типу.

Прируслове озеро і ставок в безпосередній близькості до русла **річки Жихорець** (притока р. Уди) біля с. Федірці (м. Харків; 49.927, 36.322) були досліджені в 2023 році. Вибірка з 33 особин зелених жаб містила: 25 особин *P. esculentus* (1 самицю і 24 самця) та 8 особин *P. ridibundus* (5 самиць і 3 самця).

Вимірювання довжини еритроцитів продемонструвало наявність 4 особин *P. esculentus* з еритроцитами >27 мкм (Рис. 3.5), що цілком ймовірно свідчить про триплоїдію цих жаб. Втім, результати мікросателітного аналізу (неопубліковані дані) не дають однозначної відповіді, можливо, через гомозиготність їхніх подвоєних геномів.

Цей локалітет з чималою ймовірністю населяє геміклональна популяційна система R-E-Er типу, що в разі підтвердження стало б першою знахідкою триплоїдів в басейні Уд. Для даного локалітету також відомі знахідки особин *P. ridibundus*, що мали такий нехарактерний стан морфологічної ознаки, як жовтизну стегон.

3.5.6. Басейн ріки Мож

Притерасне озеро долини річки Мож (49.749, 36.162) в селі **Тимченки** було досліджене впродовж 2019-2021 років на трьох вибірках, що включали сумарно 109 дорослих особин та 56 ювенілів. Видову приналежність та стать дорослих визначали за зовнішньою морфологією. Для ювенілів визначалася лише стать, за морфологією гонад. Для всіх особин була проміряна довжина тіла та середня довжина еритроцитів (лів. пункт 3.6). Для всіх особин з найбільшими еритроцитами плоідність була визначена за допомогою каріології метафазних пластнок. Для триплоїдів був визначений геномний склад за допомогою DAPI-зabarвлення.

Триплоїди були знайдені у вибірках всіх років та серед обох статей гібридів. Частка триплоїдів коливалася між ювенілами (9%) та дорослими (1%) суттєво, але не значущо ($p = 0.078$). Zabarвлення показало, що усі триплоїди

мали геномний склад LLR, жодного LRR не було виявлено (Рис. 3.5; Drohvalenko et al. 2021).

Species, sex, ploidy, and age of analyzed water frogs by years. Dash line denotes the absence of correspondence age in some samples; zero denotes the forms which were not observed.

Form of water frog			Year of sample		
Ploidy	Species	Sex	2019	2020	2021
Diploid (2n)	<i>P. esculentus</i>	Male	–	43	47
		Female	–	0	1
	<i>P. ridibundus</i>	Male	–	0	3
		Female	–	1	12
	Juveniles (undefined species)	Male	18	–	10
		Female	5	–	18
Triploid (3n)	<i>P. esculentus</i>	Male	–	2	0
		Female	–	0	0
	Juveniles (<i>P. esculentus</i>)	Male	2	–	1
		Female	2	–	0
	Overall			27	46

Рисунок 3.5. Вид, стать, вік та плоїдність досліджених зелених жаб з озера в с. Тимченки. «-» означає відсутність жаб відповідного віку у вибірці даного року (за Drohvalenko et al. 2021)

Ставок Орсовський в м. Південне (49.885, 36.042) належить до басейну річки Мерефа, що є притокою річки Мож. Місцева геміклональна популяційна система була досліджена в 2023 році (вперше після досліджень початку століття; Korshunov 2008).

Було зібрано 30 особин зелених жаб, серед яких морфологічно було визначено: 1 самиця *P. ridibundus*, 23 самця *P. esculentus* та 6 ювенілів (без точного визначення). Самиця озерної жаби мала розміри 106.01 мм, самці гібридів мали середній розмір 68.63 мм (48.22-84.32 мм), ювеніли сягали 36.92 мм (29.30-48.16).

Середня довжина еритроцитів виявилася цілком «диплоїдною» у всіх ювенілів (22.54 мкм в середньому), у озерної жаби (23.23 мкм) та у 22 гібридів – 24.37 мкм (23.72-24.72 мкм). Однак, у одного (найбільшого за розмірами) гібрида довжина еритроцитів свідчила про потенційну триплоїдію – 28.24 мкм (Рис. 3.6).

Деякі ГПС Харківської області

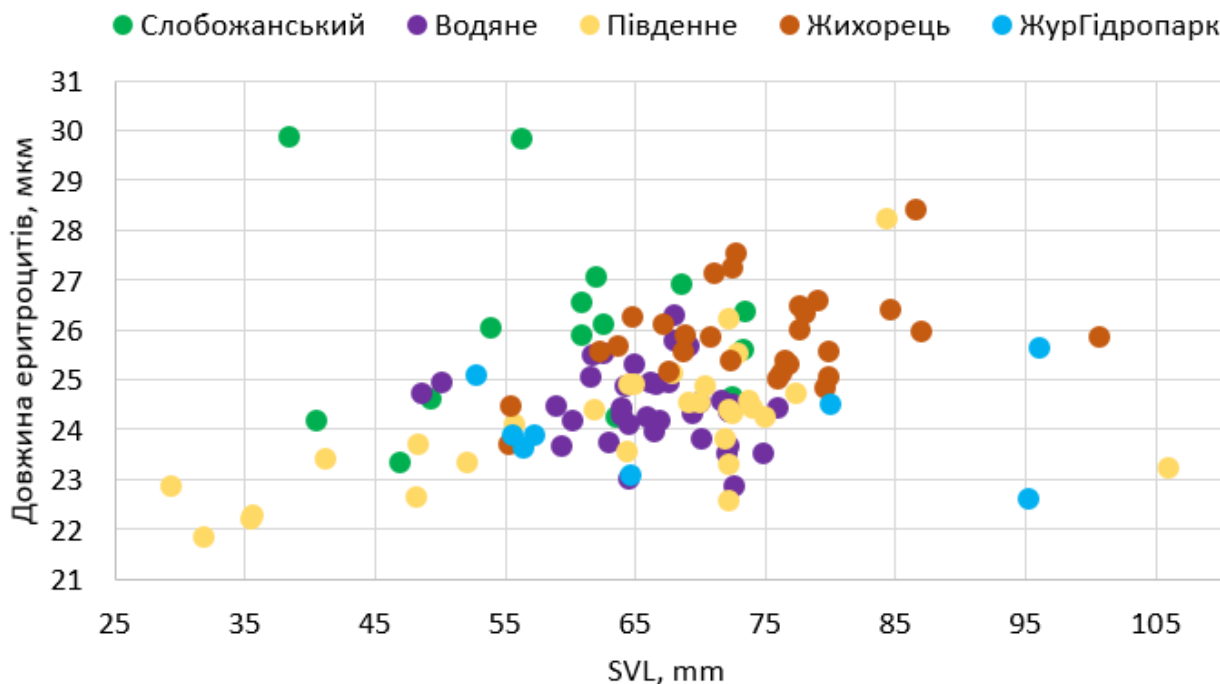


Рисунок 3.6. Розподіл зелених жаб з деяких водойм Харківщини за їхніми розмірами тіла та середньою довжиною еритроцитів

В разі підтвердження (молекулярними чи каріологічними методами) триплоїдії серед гібридів в басейні р. Мерефа, це стало б свідченням про ще ширші межі «триплоїдного регіону» Сіверсько-Донецького центру різноманіття, оскільки даний локалітет розташований ще північніше останнього виявленого (с. Тимченки) і в наступній за ієрархією (вторинній) притоці Сіверського Донця.

Штучні ставки (49.739, 36.052) біля села Бірки створені у системі ярів, що впадають у долину річки Мож. Дослідження 2020 року підтвердили присутність *P. esculentus* та *P. ridibundus* у кількох з них, що засвідчує існування тут ГПС R-E типу. Детальних даних щодо складу і будь-яких даних щодо плідності місцевих гібридів бракує, тому впевнено говорити про зв'язок з R-E-Ер системами річки Мож поки що не можна.

Триплоїди з усього R-E субрегіону Сіверсько-Донецького центру різноманіття ГПС (Рис. 1.3), що класифікувався як регіон поширення

диплоїдних ГПС (Шабанов 2015), до даного дослідження не були відомі.

Припускається три причини цього:

- недавня міграція LR-особин, здатних продукувати диплоїдні гамети, до р. Мож та р. Уди з найближчих локалітетів існування R-E-Er систем (русло Сіверського Донця нижче за течією);
- недавня еволюція гібридів в місцевій ГПС здатності продукувати диплоїдні гамети;
- давнє існування триплоїдних гібридів в місцевих ГПС непоміченими.

Внаслідок малого розміру вибірок, вивчених до даного дослідження, а також малої частки триплоїдних гібридів виявлених зараз – третя гіпотеза може вважатися найбільш правдоподібною. В будь-якому випадку, це перша зареєстрована присутність триплоїдних гібридів поза межами «триплоїдного субрегіону» Сіверсько-Донецького центру різноманіття (Шабанов 2015; Шабанов et al. 2017; Drohvalenko et al. 2021).

3.5.7. Річка Оскол

Для території річки Оскол (ліва притока р. Сіверський Донець) не наводилися дані щодо розповсюдження геміклональних популяційних систем, а лише батьківського виду *P. ridibundus* (Korshunov 2008; Шабанов et al. 2017). Однак, польові і лабораторні дослідження з 2017 по 2021 роки засвідчили перші знахідки *P. esculentus* в цьому регіоні (Drohvalenko et al. 2021, Fig. 1).

Перші знахідки гібридів були зареєстровані у м. **Дворічна** на піщаному пляжі р. Оскол (49.848, 37.699) в 2017 році (червень і вересень) – загальна кількість виявлених гібридів обох статей сягнула 7 особин. Подальше дослідження, проведене під час студентської практики у червні 2020 року на території НПП «Дворічанський» виявило *P. esculentus* обох статей прямо в прируслових біотопах р. Оскол (49.946, 37.799); окремо була зареєстрована акустична активність самців *P. esculentus*. Дослідження водойм басейну р.

Оскол в межах НПП «Дворічанський» в червні 2021 року дозволило зареєструвати присутність, вочевидь, окремої R-E ГПС у штучному ставку в яру, що впадає в долину р. Оскол (49.961, 37.794): загальна вибірка склала 5 особин, з яких 2 були *P. ridibundus*, а 3 були самцями *P. esculentus*; цікаво, що присутність гібридів на руслі зареєструвати не вдалося, не зважаючи на спеціальні пошуки.

Даних щодо плідності гібридів в басейні р. Оскол бракує. Випадкова частина особин була перевірена молекулярними методами в рамках дослідження патогенів амфібій у Ягеллонському університеті: було зареєстровано лише диплоїдів.

В будь-якому разі, ці знахідки є першими підтвердженими знахідками гібридів в українській частині басейну р. Оскол. Гіпотези, що пояснюють це явище, включають в себе:

- існування *P. esculentus* в даному регіоні завжди у малих кількостях, уникаючи реєстрації – малоімовірно, враховуючи чітко відмінні шлюбні пісні самців та ряд спеціальних досліджень фауни парку (Zinenko, Korshunov, і Turikov 2014);
- розселення гібридних особин та заснування місцевих ГПС – ця гіпотеза методом виключення здається найбільш ймовірною, але потребує дослідження і уточнення шляху розселення: з верхів'я річки (Середньоруська височина) чи з низів'я (з Сіверського Донця, для якого характерне високе різноманіття ГПС).

3.6. Динаміка складу п'яти ГПС басейну Сіверського Донця

Грунтуючись на даних багаторічного моніторингу, а саме 2012-2021 роки (з 2016 року автор особисто брав активну участь в усіх моніторингах), було

проаналізовано та порівняно склад і динаміку складу п'яти геміклональних популяційних систем.

Усі 5 ГПС населяють штучні ставки: ставки Корякова яра (49.615, 36.311) та яра в с. Замулівка (підпункт 3.5.1) належать басейну Сіверського Донця, ставок Добрицького яру – долині р. Гомольші (околиці м. Зміїв; 49.556, 36.309), став Іськова яра (49.627, 36.282) та притерасний став Тимченків (підпункт 3.5.5) належать басейну р. Мож. Добрицький, Коряків та Іськів ставки належать до НПП «Гомільшанські ліси».

Усі п'ять ГПС належать до R-E-Ep типу.

Дані, що ґрунтуються на результатах багаторічного моніторингу цих ставок, опубліковані у наступних працях:

- Іськів – E.V. Meleshko і Kravchenko (2012); Баран et al. (2013); O.V. Meleshko, Korshunov, і Shabanov (2014); Черепашук et al. (2015); Горенский et al. (2017); Biliaiev et al. (2018); M. Drohvalenko, Pustovalova, і Fedorova (2019); M.O. Drohvalenko et al. (2023)
- Коряків – Ермаков і Тарасенко (2016); Стах et al. (2016); Фомичева і Лобойко (2017); Biliaiev et al. (2018); Fedorova et al. (2019); Zahoruiko et al. (2021)
- Тимченки – Pustovalova, Fedorova, і Drohvalenko (2021); Drohvalenko, Pustovalova, і Fedorova (2021)
- Добрицький – Михайленко et al. (2013); Вакуленко, Мелешко, і Хазеева (2014); Meleshko, Korshunov, і Shabanov (2014); Русаченко et al. (2016); Fomenko et al. (2017); Siervatovska і Teplenko (2018); Biliaiev et al. (2018); Pustovalova et al. (2019)
- Замулівка (колишнє Жовтневе) – (Клемперт і Ус (2012); Лаптий, Зюбрій, і Мелешко (2013); Meleshko, Korshunov, і Shabanov (2014)

Чисельність популяційних систем оцінювалася не щороку. Дані щодо чисельності присутні для таких ГПС:

- Іськів:

- 2012 рік – 697±224 особин (E.V. Meleshko i Kravchenko 2012);
- 2015 рік – 201±19 особин (Черепашук et al. 2015);
- 2018 рік – 374±143 особин (Biliaiev et al. 2018);
- Коряків:
 - 2015 рік – 413±177 особин (Стах et al. 2016);
 - 2019 рік – 511±155 особин (Fedorova et al. 2019);
 - 2021 рік – 667±196 особин (Zahoruiko et al., 2021);
- Добрицький:
 - 2014 рік – 1317±639 (Вакуленко, Мелешко, і Хазеева 2014)
 - 2016 рік – 2328 ± 926 особин (Русаченко et al. 2016)
 - 2018 рік – 1264 ± 619 особин (Biliaiev et al. 2018)

Як видно, траєкторії чисельності цих систем відмінні. Чисельність ГПС Іськова става за період 2012-2018 років різко впала, аби потім почати збільшуватися; чисельність ГПС Корякова става невпинно зростала впродовж 2015-2018 років; чисельність ГПС Добрицького става зросла майже вдвічі і потім майже вдвічі зменшилася за період 2014-2018 років.

Наведені далі результати аналізу стосуються лише спійманих в дикій природі жаб (статевозрілих та нечисельних ювенільних), без пуголовків та експериментальних даних. Вид та стать визначалися морфологічно, плідність визначалася за допомогою всіх доступних методів (див. Розділ 2). Вибірки формувалися випадково, але в нерестовий період – і тому статевий склад вибірок був завідомо зміщений внаслідок різної поведінки самців і самиць під час нересту (Wells 2007). У тварин вимірювалася довжина SVL; особини менше 45 мм визначалися як «ювенільні».

Плідність більшості особин визначалася за середньою довжиною еритроцитів шляхом статистичної апроксимації межі між ди- та триплоїдами окремо на основі даних кожного року. Плідність та вид деяких особин були уточнені за допомогою методу каріології метафазних пластинок, а також як

наслідок генотипування з використанням мікросателітного аналізу, аналізу видоспецифічних SNP, FISH; детально про це йдеться далі.

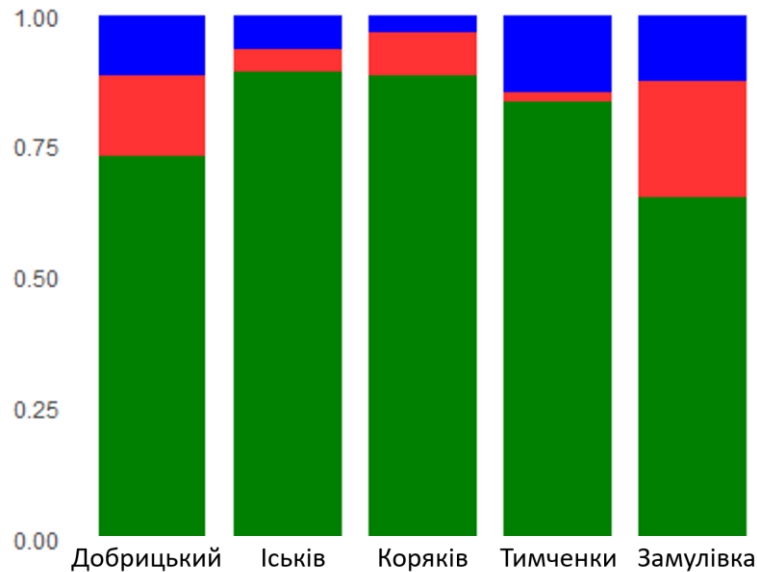
У всіх вибірках всіх років у всіх розглянутих тут популяційних системах стабільно домінував гібрид *P. esculentus* – середня його частка у вибірках становила 88% (84-92%) (Рис. 3.7). В певні роки у вибірках з окремих систем озерних жаб не ловилися зовсім або ловилися одиничні особини. Вірогідно, велику роль в цьому грають екологічні умови: ГПС з найвищою зафіксованою часткою озерних жаб – Тимченки, на межі заплави річки Мож, а з найнижчими – ставки на віддаленні від великих водойм (Іськів став суттєво ізольований від будь-яких).

ГПС (став)	Вид	Рік моніторингу										Загалом
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Добрицький	<i>P. esc</i>	24 (96%)	69 (88%)	54 (84%)	126 (92%)	112 (84%)	44 (92%)	74 (94%)	44 (86%)	41 (93%)	53 (79%)	641 (88%)
	<i>P. rid</i>	1 (4%)	9 (12%)	10 (16%)	11 (8%)	22 (16%)	4 (8%)	5 (6%)	7 (14%)	3 (7%)	14 (21%)	86 (12%)
Іськів	<i>P. esc</i>	157 (98%)	99 (77%)	53 (98%)	146 (83%)	37 (86%)	131 (96%)	85 (100%)	110 (99%)	56 (98%)	14 (100%)	888 (92%)
	<i>P. rid</i>	4 (2%)	29 (23%)	1 (2%)	29 (17%)	6 (14%)	6 (4%)	0 (0%)	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	77 (8%)
Коряків	<i>P. esc</i>				78 (94%)	30 (81%)	162 (95%)	94 (100%)	152 (78%)	40 (100%)	123 (99%)	679 (91%)
	<i>P. rid</i>				5 (6%)	7 (19%)	8 (5%)	0 (0%)	43 (22%)	0 (0%)	1 (1%)	64 (9%)
Тимченки	<i>P. esc</i>								20 (77%)	45 (98%)	48 (76%)	113 (84%)
	<i>P. rid</i>								6 (23%)	1 (2%)	15 (24%)	22 (16%)
Замулівка	<i>P. esc</i>	61 (94%)	29 (81%)	61 (84%)	21 (81%)	22 (81%)						194 (85%)
	<i>P. rid</i>	4 (6%)	7 (19%)	12 (16%)	5 (19%)	5 (19%)						33 (15%)

Рисунок 3.7. Видовий склад у % розглянутих ГПС в роки їх моніторингу та сумарно. Всюди щороку і сумарно суттєву більшість становили гібриди.

Для розглянутих в даному дослідженні систем було досліджено їхній склад з точки зору присутності в них трьох основних «форм» зелених жаб: диплоїдні (2n) гібриди *P. esculentus* (надалі позначаються зеленим кольором), триплоїдні (3n) гібриди *P. esculentus* (червоний/рожевий кольори) та озерні жаби *P. ridibundus*.

Сумарний склад п'яти досліджених систем – з точки зору композиції згаданих вище форм, серед дорослих особин, для яких плоїдність була визначена будь-яким способом, – наведений на Рис. 3.8. У всіх системах зареєстровані всі три форми, а отже всі ці системи можуть вважатися геміклональними популяційними системами R-E-Ep типу.



Локалітет (став)	Форма зелених жаб		
	<i>P. rid</i>	3n <i>P. esc</i>	2n <i>P. esc</i>
Добрицький	82 (11,5%)	110 (15,5%)	519 (73%)
Іськів	55 (6,4%)	40 (4,6%)	768 (89%)
Коряків	22 (3,3%)	54 (8,1%)	587 (88,5%)
Тимченки	16 (14,7%)	2 (1,8%)	91 (83,5%)
Замулівка	28 (12,7%)	49 (22,3%)	143 (65%)

Рисунок 3.8. Співвідношення груп зелених жаб у розглянутих ГПС сумарно за роки їх моніторингу: синій – *P. ridibundus*, червоний – 3n *P. esculentus*, зелений – 2n *P. esculentus*

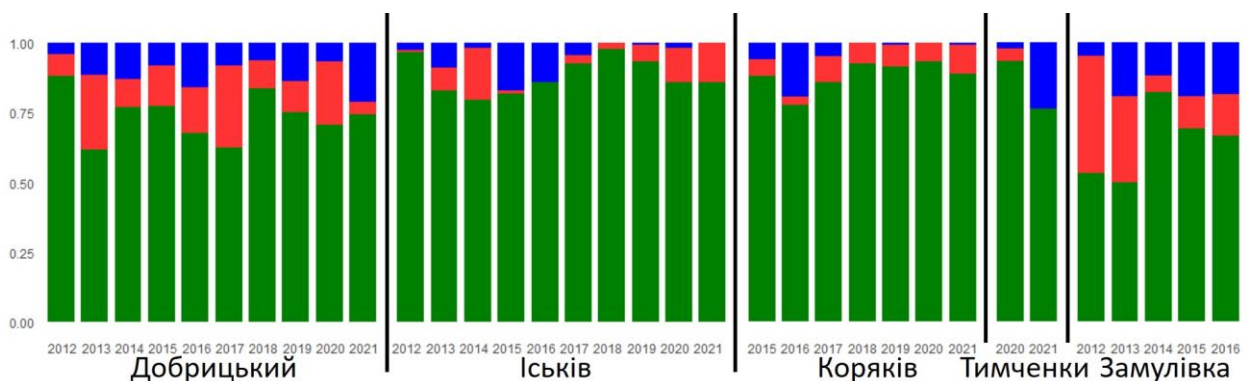
Сумарний склад порівнюваних ГПС (за трьома формами) відрізнявся між собою значуще: $p < 0.001$ (точний тест Фішера). Попарне порівняння показало значущі різниці між складами всіх досліджених систем (Рис. 3.9).

	Іськів	Коряків	Тимченки	Замулівка
Добрицький	0,000	0,000	0,000	0,045
Іськів		0,001	0,007	0,000
Коряків			0,000	0,000
Тимченки				0,000

Рисунок 3.9. Значущість результатів попарного порівняння складу (за трьома формами) порівнюваних ГПС; p значущих різниць виділено червоним

Найменш виражена (і все одно значуща) різниця виявилася між ГПС Добрицького ставка та Замулівки; попередній рисунок дає візуальне уявлення про причини цього: висока частка і триплоїдів, і батьківського виду в обох системах. Втім, відомо, що ці системи принципово відрізняються – ГПС Замулівки містить лише одну статеву і генетичну форму триплоїдів (LLR-самиць), в той час як в Добрицькому ставку спостерігається надзвичайне різноманіття форм (Meleshko, Korshunov, і Shabanov 2014); Шабанов 2015).

Склад кожної системи змінювався по роках також значуще – для усіх ГПС $p < 0.001$ (і критерій χ^2 , і точний тест Фішера). Частка диплоїдних гібридів всюди завжди лишалася стабільно високою, тож вклад у візуальну відмінність вносили інші дві форми: триплоїди та озерні жаби. Практично в кожній системі частки обидвох цих форм сильно знижувалися або взагалі зникали в деякі роки: ГПС Іськова ставка та Тимченків демонстрували відсутність триплоїдів у вибірках, Коряків та Іськів стави демонстрували вкрай низьку частку озерних жаб впродовж останніх 4-5 років моніторингу. Системи в Добрицькому ставку та Замулівці навпаки, час від часу демонстрували порівняно велику частку триплоїдів (Рис. 3.10).



Локалітет (став)	Форма	Рік моніторингу									
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Добрицький	<i>P. rid</i>	1 (4%)	9 (11,5%)	8 (13,1%)	11 (8,1%)	21 (16,2%)	4 (8,3%)	5 (6,3%)	6 (13,6%)	3 (6,8%)	14 (21,2%)
	<i>3n P. esc</i>	2 (8%)	21 (26,9%)	6 (9,8%)	20 (14,7%)	21 (16,2%)	14 (29,2%)	8 (10,1%)	5 (11,4%)	10 (22,7%)	3 (4,5%)
	<i>2n P. esc</i>	22 (88%)	48 (61,5%)	47 (77%)	105 (77,2%)	88 (67,7%)	30 (62,5%)	66 (83,5%)	33 (75%)	31 (70,5%)	49 (74,2%)
Іськів	<i>P. rid</i>	3 (2,7%)	8 (9,1%)	1 (2%)	29 (17,1%)	6 (14%)	6 (4,4%)	0 (0%)	1 (0,9%)	1 (1,8%)	0 (0%)
	<i>3n P. esc</i>	1 (0,9%)	7 (8%)	9 (18,4%)	2 (1,2%)	0 (0%)	4 (2,9%)	2 (2,4%)	6 (5,6%)	7 (12,3%)	2 (14,3%)
	<i>2n P. esc</i>	109 (96,5%)	73 (83%)	39 (79,6%)	139 (81,8%)	37 (86%)	127 (92,7%)	83 (97,6%)	100 (93,5%)	49 (86%)	12 (85,7%)
Коряків	<i>P. rid</i>				5 (6%)	7 (19,4%)	8 (4,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	1 (0,8%)
	<i>3n P. esc</i>				5 (6%)	1 (2,8%)	16 (9,4%)	7 (7,4%)	10 (7,9%)	2 (6,7%)	13 (10,5%)
	<i>2n P. esc</i>				73 (88%)	28 (77,8%)	146 (85,9%)	87 (92,6%)	115 (91,3%)	28 (93,3%)	110 (88,7%)
Тимченки	<i>P. rid</i>									1 (2,2%)	15 (23,8%)
	<i>3n P. esc</i>									2 (4,3%)	0 (0%)
	<i>2n P. esc</i>									43 (93,5%)	48 (76,2%)
Замулівка	<i>P. rid</i>	3 (4,7%)	7 (19,4%)	8 (11,9%)	5 (19,2%)	5 (18,5%)					
	<i>3n P. esc</i>	27 (42,2%)	11 (30,6%)	4 (6%)	3 (11,5%)	4 (14,8%)					
	<i>2n P. esc</i>	34 (53,1%)	18 (50%)	55 (82,1%)	18 (69,2%)	18 (66,7%)					

Рисунок 3.10. Співвідношення груп зелених жаб у розглянутих ГПС по роках їх моніторингу (серед дорослих особин, для яких плоідність була визначена будь-яким способом): синій – *P. ridibundus*, червоний – *3n P. esculentus*, зелений – *2n P. esculentus*

Мірою оцінки схожості систем було також обрано діапазон, в якому змінювалася частка тієї чи іншої форми у кожній системі за роки моніторингу. Графічне уявлення про такі діапазони в різних ГПС дає bar-plot на Рис. 3.11. Попарне порівняння наборів значень частки кожної з форм за період моніторингу між ГПС продемонструвало значущу різницю між кількома системами лише за часткою диплоїдних гібридів – діапазони коливання часток триплоїдів і озерних жаб відрізнялися в рамках не більше тенденції. Найбільш схожими (без значущих відмінностей) виявилися системи: Замулівки та Добрицького ставка, а також Корякова, Іськова ставків та ставка в Тимченках. Останню трійку систем об'єднують в середньому рідкісні триплоїди в їхньому складі. Втім, у Тимченках теж виявлено лише LLR-гібридів серед триплоїдів, а ГПС всіх трьох ставків функціонують по-різному з точки зору відтворення і добору – про це детальніше в Розділі 5.

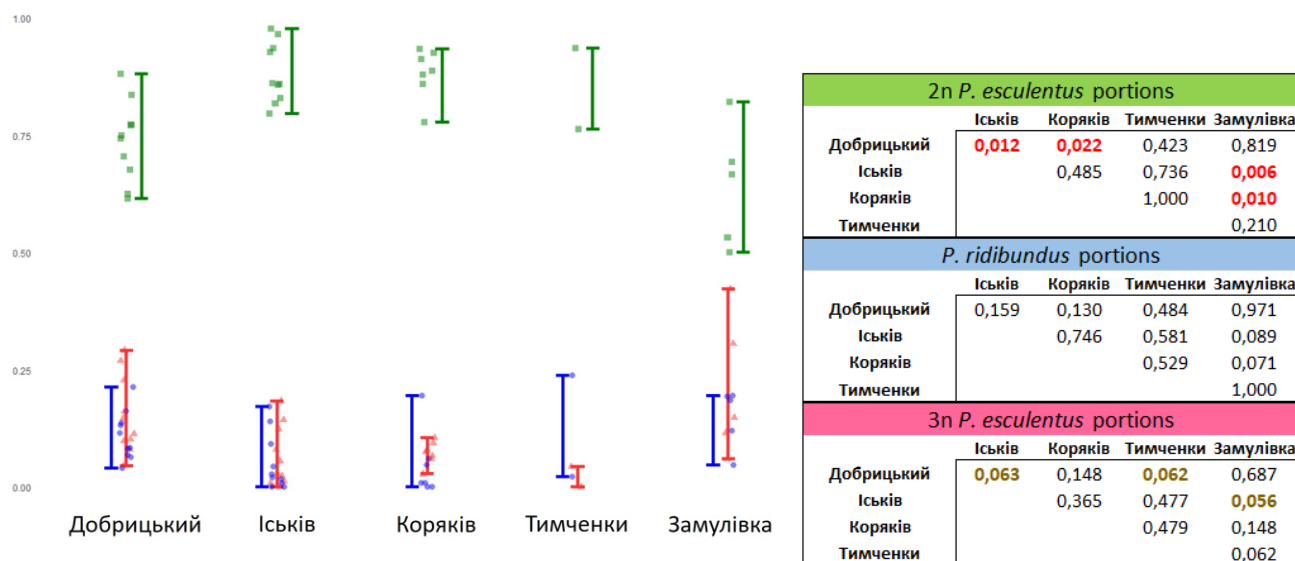


Рисунок 3.11. Діапазони часток кожної з форм у досліджених ГПС за періоди їх моніторингу (ліворуч); попарне порівняння (тест Дана, поправка Хольма-Бонфероні; праворуч) діапазонів між ГПС; р значущих різниць виділено червоним, р різниць на межі тенденції (0.05-0.1) виділено жовтим. Кольори на двох графіках відповідають тим самим формам.

Тип кожної ГПС визначається наявністю тих чи інших батьківських видів та форм гібридів у її складі. Тим не менш, ГПС здатні до еволюції, що може призводити до зміни їхнього типу. Використовувати в якості мірила зміни стану системи коливання частки диплоїдних гібридів має мало сенсу – занадто велика частка стабільно спостерігалася у всіх п'ятьох ГПС. В якості такого критерія було запропоновано (Biliaiev et al. 2018) використовувати розташування системи в координатах «частка триплоїдів vs частка озерних жаб». Наявність чи відсутність будь-якої з цих форм у системі принципово визначає її тип; триплоїди гіпотетично (Ditte G Christiansen 2009) здатні до продукування рекомбінантних гамет, як і батьківський вид, що мало б суттєво урізноманітнювати генофонд системи.

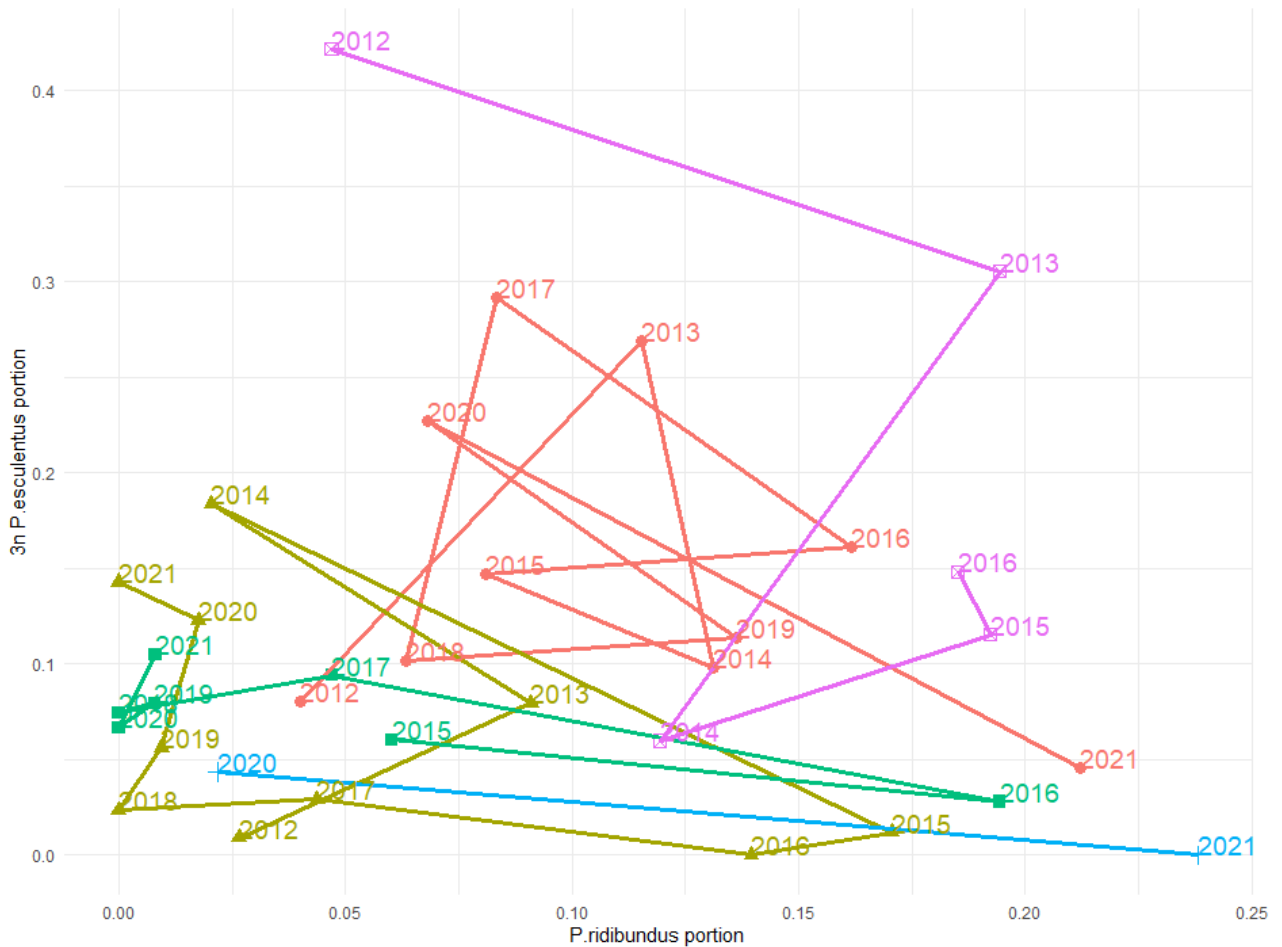


Рисунок 3.12. Взаємні коливання частки *P. ridibundus* (вісь абсцис) та $3n$ *P. esculentus* (вісь ординат) в досліджених системах за роки моніторингу. Окремі стани систем характеризують їх як R-E, R-E-Ep або чисто E системи.

Траєкторія кожної системи в цих координатах наочно демонструє відмінності між всіма дослідженими тут системами (Рис. 3.12).

ГПС Добрицького ставка (червоне) коливається у більш-менш стабільній ділянці заданого простору – не втрачаючи і не надбаючи занадто ні триплоїдів, ні озерних жаб.

ГПС Замулівки (лілове) демонструє дещо схожу траєкторію з, втім, більш різкими змінами. На жаль, моніторинг цієї системи призупинився у 2016 році, не даючи змогу відстежити її динаміку на більшій кількості вибірок.

ГПС Тимченків (блакитне) моніториться не так давно, але навіть два її стани дають підстави вважати, що система коливається біля стану системи R-E типу з рідкими появами триплоїдів.

Траєкторії ГПС Корякова (зелене) і Іськова (жовте) ставків найцікавіші: обидві системи балансують навколо станів R-E-системи та повністю гібридної E(all-hybrid)-системи – першому відповідають точки внизу графіка (біля чи на нулі частки *P. ridibundus*), а другому ліворуч (біля чи на нулі частки триплоїдних *P. esculentus*). Більше того, для ГПС Корякова яра спостерігається помірно-сильна зворотна кореляція між частками цих двох форм зелених жаб: $\rho = -0.804$, $p = 0.029$. Для системи Іськова яра такої кореляції не спостерігається: $\rho = -0.498$, $p = 0.142$.

Траєкторії останніх двох систем додатково підкреслюють необхідність систематичного моніторингу в дослідженнях динаміки ГПС: поодинокі, а тим паче маленькі, вибірки можуть просто не включити в себе деяких форм, а отже нерепрезентативно відобразити склад системи – тим самим невірною вказавши на її тип та, як наслідок, еволюційно-генетичні процеси в ній.

Висновки Розділу 3

- Встановлено склад геміклональних популяційних систем *Pelophylax esculentus* complex на території України в межах таких найкрупніших басейнів річок: Західного Бугу (власне Західний Буг та Кам'янка), Дунаю (Прут), Дніпра (власне Дніпро, Удай, Сейм, Псел, Мерла) та Сіверського Донця (власне Донець, Уди, Харків, Лопань, Оскол). Різноманіття виявлених ГПС включає L-E, R-E, L-E-R типи; окремі локалітети не містили ГПС (русло і частина пониззя Дніпра); присутність жодної ГПС справжнього E-типу не підтверджено.
- Досліджені популяційні системи були проаналізовані усією сукупністю методів на предмет наявності триплоїдних *P. esculentus*.

Виявлено, що розповсюдження триплоїдів може бути ширшим, ніж вважалося до того: нові локалітети, потенційно населені триплоїдами, включають прируслові ліві притоки Прута (р. Совиця), ділянки р. Прип'ять (Чорнобильська Зона), дельту Дніпра (м. Гола Пристань) і периферію його притоків (р. Мерла), басейн Західного Бугу (околиці м. Львів), а також праві притоки р. Сіверський Донець північніше відомого R-E-Ep субрегіону центру різноманіття зелених жаб (р. Мож, р. Мерефа, р. Жихорець).

- Зареєстровані нові локалітети існування ГПС *P. esculentus* complex в басейні р. Оскол (Харківська область). Такі знахідки дозволяють припустити здатність *P. esculentus* до експансії свого ареалу.
- На прикладі порівняння складу і річної динаміки 5 ГПС Харківської області показано, що навіть ГПС однакового R-E-Ep типу здатні суттєво відрізнятися за своїм складом і регулярно (з року в рік) змінювати його. Динаміка одних таких ГПС включає коливання навколо того самого типу системи, динаміка інших ГПС включає їхнє проходження по межі інших типів системи (диплоїдна R-E або чиста E-Ep).

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОНТОГЕНЕЗУ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ

Процеси взагалі і добір зокрема, що відбуваються в геміклональних популяційних системах, стосуються багатьох рівнів організації живої матерії: клітинного (функціонування та елімінація геномів), тканинного (поведінка зародкової лінії клітин, особливості гаметогенезу), організмowego (розвиток та поведінка окремих особин) та популяційно-видового (динаміка взаємозалежних сукупностей особин) (Шабанов 2015; Shabanov et al. 2020).

Вивчення організмowego рівня загалом передбачає розгляд онтогенезу окремих особин, а у випадку ГПС – онтогенез особин здатен дати відповідь на питання їхнього функціонування. Адже невід’ємний добір у геміклональних системах, що усуває частину особин, безперечно має проявлятися на індивідуальному рівні, задаючи траєкторію розвитку, що призводить в одному випадку до закономірної загибелі, а в іншому – до зрілості та розмноження.

Врешті – дослідження розвитку представників *P. esculentus complex* може слугувати практичній меті кращої ідентифікації всіх генетичних форм цього комплексу на якомога більш ранніх етапах життя.

4.1. Нормальний розвиток

Розвиток різних видів безхвостих амфібій, у тому числі з роду *Rana* (куди раніше включалися також види роду *Pelophylax*) досліджувався багатьма авторами ще з першої половини ХХ сторіччя. Таблиці нормального розвитку різної деталізації та для різних етапів онтогенезу (лише для личинок чи для личинок та дорослих особин, окремі етапи тощо) були складені для ряду видів, як-от: *Rana pipiens* (Shumway 1940; 1942; Taylor і Kollros 1946), *Rana viridis* (Wintrebert, 1905; невалідний таксон, в який входили також і представники зелених жаб (за Taylor і Kollros 1946)), *Rana sylvatica* (Pollister і Moore 1937),

Rana temporaria, *Xenopus laevis* (Детлаф 1975; Dettlaff і Vassetzky 1991), *Rana dalmatina* (Cambar і Marrot 1954), *Bufo valliceps* (Limbaugh і Volpe 1957), *Bufo quercicus* (Volpe і Dobie 1959), *Hyla regilla* (Eakin 1947), *Bufo cognatus* (Bragg 1936), *Microhyla carolinensis* (Orton 1946), *Scaphiopus holbrooki* (Gosner і Black 1954), *Rana arvalis* (Tschernoff 1907 (за Taylor і Kollros 1946)).

Деталізація таких схем була різною. Більшість досліджень була направлена на збагачення об'єктної бази для досліджень ембріології. За словами деяких авторів (Pollister і Moore, 1937), вони відчували гостру потребу у «спільній мові» для розвитку безхвостих. Але наведені праці, окрім того, що стосувалися багатьох різних, подекуди суттєво неспоріднених видів, також були проведені за суттєво відмінними методами. Наприклад, практикувався як збір личинок з природніх популяцій, так і вирощування отриманих в лабораторії, в тому числі завдяки методам штучного схрещування. Інші автори так чи інакше відмічали брак загального опису для личинок безхвостих (Taylor і Kollros 1946; Limbaugh і Volpe 1957).

Серед дослідників того періоду конкретно зеленим жабам було присвячено небагато зусиль, тим паче що феномен їхньої геміклональності ще не був описаний. Окремі нотатки щодо ходу розвитку та відмінностей його у різних видів, що нині відносяться до роду *Pelophylax*, з'являються хіба що у книзі Терентьєва «Лягушка» (1950) – і вони дані вельми приблизно.

Кроком, що назавжди змінив підхід до вивчення розвитку безхвостих амфібій, стала праця Konrad Gosner (1960). В ній, на основі масиву даних щодо розвитку різних видів (як мінімум Pelobatidae, Hylidae, Bufonidae та Ranidae), було запропоновано концептуальну схему опису розвитку будь-якого виду безхвостих, ґрунтуючись на принципових морфологічних рисах спочатку ембріона, а потім вільноплаваючої личинки (розвиток ротового апарата, зябер, оперкульома, задніх та передніх кінцівок).

На межі століть та у ХХІ столітті вийшли монументальні праці, що підсумували вивчення онтогенезу та екології різних груп, як-от (McDiarmid і

Altig «Tadpoles» (1999). Altig i McDiarmid (2015) також надають детальний ключ для морфології личинок – але лише американських видів. Праця Fox (1984) розглядає узагальнені аспекти морфогенезу у личинок різних амфібій. Книга Rugh (1962) стала однією з класичних праць по методології лабораторних ембріологічних досліджень амфібій загалом.

Для *P. esculentus* complex таблиць нормального розвитку наразі не існує.

Окремі дослідження ранніх етапів розвитку (пуголовків) *P. esculentus* complex проводилися в рамках студентських практик на матеріалі з Сіверсько-Донецького центру різноманіття (Белкина і Брилева 2010; Афоничева et al. 2010; Бирик 2010; Бирик, Коваленко, і Кучкова 2010; Виноградская, Толокнеева, і Комарова 2010; Михайлова 2011; Губенко і Михайлова 2012; Сапожникова і Пырина 2013; Н. А. Дрогваленко і Черненко 2014; Пустовалова, Батуева, і Харченко 2015; Шерстюк et al. 2016; Лукан, Пустовалова, і Бірюк 2017). Такі дослідження не завжди мали на меті саме особливості розвитку, але так чи інакше були прив'язані до віку, стадії та, безумовно, форми досліджуваних особин.

Морфологія личинкових стадій розвитку видів роду *Pelophylax* часто досліджувалася саме на прикладі окремих видів (наприклад, Arifulova i Chirikova 2018; Amanat Behbahani, Nokhbatolfoghahai, i Esmaceli 2014). Деталі розвитку батьківських видів *P. lessonae* та *P. ridibundus* були освітлені у дисертації Ткаченко (Tkachenko 2019), та раніших роботах (Ткаченко 2004; Tkachenko 2017). Автор дослідила і порівняла темпи розвитку озерної та ставкової жаб, а також надала ознаки, характерні для різних видів.

Серед перших і відомих робіт, що висвітлювала (і порівнювала) морфологічний розвиток пуголовків представників *P. esculentus* complex була праця Günther (1978). Її результати постулювали наявність відмінностей між пуголовками гібридів та батьківських видів, що ґрунтуються лише на кількох зовнішніх промірах. До того ж, зважаючи на давність цієї праці, можна

піддавати справедливому сумніву точність ідентифікації форм зелених жаб, використаних у дослідженні.

4.2. Прижиттєва методика штучного схрещування

Для надійного вивчення розвитку цілком конкретних форм жаб або гібридів (як-от Kawamura, Nishioka, i Ueda 1980), дослідники так чи інакше приходять до необхідності використовувати штучні схрещування у контрольованих умовах між обраними тваринами. «Штучність» таких схрещувань охоплює широкий діапазон методів.

Найпростішим варіантом є збирання готових до спарювання особин чи навіть таких, що вже перебувають у амплексусі, в дикій природі (Berset-Brändli et al. 2008; Michaels i Försäter 2017) – і ґрунтується на повністю самостійному відкладанні кладки парою жаб. Цей спосіб позбавляє клопотів зі стимуляцією дозрівання ікри (Parris 2001) та реалізацією гамет та шлюбної поведінки – однак, лишає частину успіху на удачу знайти саме амплексуси, а також що пара буде саме між тими формами, яких вимагає дослідження (L. Berger, Uzzell, i Hotz 1982; Leszek Berger, Rybacki, i Hotz 1994).

Інший підхід полягає у стимуляції дозрівання гамет, відкладання ікри та/або випускання сперми або шлюбної поведінки за допомогою гормональної ін'єкції (Kouba, Vance, i Willis 2009). В якості гормональної стимуляції може бути використана інтраперитонеальна ін'єкція суспензії гіпофізів безхвостих амфібій: часто *Lithobates catesbeiana* (Hasan et al. 2017) чи *R. temporaria* (Dettlaff i Vassetzky 1991). Такий спосіб в будь-якому випадку вимагає вбивства тварин для отримання суспензії гіпофізів, а тому є сумнівним з точки зору біоетики та поводження з видами, що знаходяться під ризиком (Poole i Grow 2012). Також використовують риб'ячий лютеїнізуючий гормон (LHRH, luteinizing hormone releasing hormone; Sherman et al. 2008), гонадотропний гормон (GnRH, gonadotropin releasing hormone; Godome et al. 2021) або його

синтетичні аналоги (Dedukh et al. 2017), а також людський хоріонічний гонадотропін (hCG, human chorionic gonadotropin; Lipke, Meinecke-Tillmann, і Meinecke 2009).

Отримання гамет за використання будь-якого з цих методів стимулювання може відбуватися різними шляхами. Дозріла ікра у самиці зазвичай вимагає небагато зусиль по її добуванню, а тому самиця лишається цілою (Poole і Grow 2012). На противагу цьому, широко використовується метод добування сперми за рахунок розтирання вирізаних у самця сім'яників (Islam et al. 2008; Alam et al. 2012), за якого тварина, очевидно, гине. Лише зрідка практикується прижиттєве добування уринальної сперми (Poole і Grow 2012).

Комбінації з різних методів стимуляції та отримання потомства різняться: від гормональної стимуляції з природніми амплексусами (Dmitry Dedukh et al. 2017) до стимуляції з самостійним відкладанням ікри самицею окремо від самця (Browne et al. 2006) чи навіть прижиттєвого добування фрагменту сім'яника для приготування суспензії зі сперми (Sumida et al. 2011).

Вивчення як онтогенезу, так і гаметогенезу та особливостей розмноження *Pelophylax esculentus* complex вимагає від дослідника ошадливого ставлення до тварин. З одного боку через часто невисоку чисельність унікальних популяційних систем, за якої будь-яке вбивання тварин було б нераціональною шкодою природі. З іншого боку – через пролонгований підхід до вивчення особливостей розмноження, за якого про особливості окремої тварини, що вимагатимуть подальших досліджень, можна буде судити лише за результатами вдалого схрещування. Отже, розроблена нами методика мала бути гарантовано прижиттєвою.

Усі застосовувані нами методи експериментальних схрещувань базуються на використанні гормональної стимуляції зібраних впродовж нерестового сезону тварин. Наявність сформованої ікри у самиці в деяких випадках виявляється можливим визначити за допомогою акуратної пальпації ventro-латеральних ділянок тулуба (Poole і Grow 2012). За інших рівних умов

самців обирали на основі активної шлюбної поведінки: яскравого забарвлення, шлюбної вокалізації, активних криків вивільнення та готовності до амплексуса (характерної «хапальної» поведінки) (Poole і Grow 2012).

В якості стимулу був використаний синтетичний аналог люліберіна «Сурфагон» (0.05%, «Ланс-Хім», Україна), що вводився жабам у підшкірні лімфатичні мішки (Bobrova et al. 2014). Доза коливалася навколо 2-2.5 мл для середнього розміру тварини, збільшуючись чи зменшуючись для невеликих (самці) чи особливо великих (самиці) особин.

Гамети добувалися прижиттєвим шляхом. Дослідним шляхом було встановлено, що для дозрівання і початку виходу ікри самицям потрібно приблизно доба після ін'єкції «Сурфагону». Наявність ікри у яйцєводах та клоаці зручно визначити, обережно розширюючи отвір клоаки тупими браншами пінцету і злегка стискаючи черво самиці. Для отримання ікри самицю розміщували отвором клоаки над чашкою Петрі та акуратно стискали з боків та черева, аби ікра вичавлювалася на скло. Для найкращого запліднення (доступу сперматозоїдів) згусток ікри дуже обережно розрівнювався в моношар на дні чашки Петрі.

Суспензія сперми добувалася шляхом початкової рефлексорної уринації самця, а потім промивання дистиллятом або відстояною водопровідною чи акваріумною водою клоаки самця – все це над чашкою Петрі. Дослідним шляхом встановлено, що самцям вистачало ~2 годин, аби уринальна сперма накопичилася в клоаці в достатній кількості і концентрації для проведення запліднення (Bobrova et al. 2014). Крапля суспензії з клоаки бралася для оцінки концентрації та рухливості сперматозоїдів – лише самці з великою кількістю рухливих сперматозоїдів залучалися в експеримент.

Суспензією сперми заливали отриманий моношар ікри у чашці Петрі. Ту саму суспензію сперми за потреби використовували для кількох порцій ікри, переливаючи до чергової порції ікри після кількох хвилин експозиції попередньої. Так само, кладку від однієї самиці за потреби ділили на етапі

отримання. Після експозиції, ікру лишали залитою водою (разом з суспензією сперми, якщо це було фінальне її застосування) в чашці Петрі на добу для завершення запліднення. Після доби ікру, з вже розбухшими ікр'яними оболонками, переміщували у постійні контейнери, де потомство вирощували стандартними методами (див. пункт 2.3).

Частина експериментальних схрещувань відбувалася по спрощеній процедурі: стимульовані «Сурфагоном» (ті ж дози) жаби розміщувалися попарно у ємностях з водою, з розрахунком на природній амплексус. Методика успішно випробувана для отримання експериментального потомства в рамках досліджень цікавих ГПС (пункти 5.3, 5.4). В майбутньому цей прижиттєвий підхід може стати елементом репродуктивних природоохоронних технологій (Holt, Brown, і Comizzoli 2014).

4.3. Порівняння морфології пуголовків різних форм

Для дослідження морфологічних ознак у пуголовків різної видової приналежності та різного походження, було проведено ряд експериментальних схрещувань з наступним послідовним аналізом морфології пуголовків на різних етапах розвитку (М. О. Drohvalenko 2021).

Матеріалом для дослідження розвитку були вибірки з 5 окремих кладок (Рис. 4.1) (надалі – «групи»).

Перша кладка являла собою потомство *P. lessonae*. Її батьки були спіймані у околицях смт. Краснокутськ Харківської області, районі, що населяє L-E-R система (див. підпункт 3.3.4.). Морфологічно обидва визначені як *Pelophylax lessonae*. Як чисте потомство *P. lessonae*, ця кладка отримала шифр L.s

Батьки другої кладки були відловлені у річці Харків в межах «Журавлівського Гідропарку» (див. підпункт 3.5.2. та пункт 5.4). Морфологічно обидва визначені як *Pelophylax ridibundus* – тож уся кладка представляла собою чисте потомство *P. ridibundus*, отримавши шифр RR.

Самиця з третьої кладки походить з Добрицького ставка, відомого своєю складною R-E-Ep ГПС (див. пункт 3.6). Самиця за комплексом морфологічних ознак визначена як *Pelophylax ridibundus*. Але каріологічна перевірка продемонструвала триплоїдію цієї особини, вірогідно з генотипом LRR. Самець походить з популяції зелених жаб озера-стариці заплави Сіверського Дінця біля с. Брусівка (М. О. Drohvalenko et al. 2017). Самець був визначений як *Pelophylax ridibundus*. Ґрунтуючись на даних Biriuk et al. (2016), триплоїди Сіверсько-Донецького центру різноманіття продукують гаплоїдні гамети з геномом того виду, який мають у двох екземплярах. Отже, самиця LRR мала передати нащадкам геном R, так само як і самець батьківського виду. Це означає, що уся кладка представляла собою *P. ridibundus* «нащадків триплоїда» – а тому отримала шифр R.

Також до пулу личинок, призначених для вивчення онтогенетичних особливостей, було додано нащадків двох триплоїдних самиць та озерних жаб-самців з озера-стариці заплави річки Сіверський Донець біля с. Брусівка (Drohvalenko et al. 2017). Завдяки особливостям відтворення гібридів у даній ГПС (див. пункт 5.3.), ці пуголовки аналізувалися як дві гомогенні, вірогідно триплоїдні групи з шифрами T та T1. Личинки цієї форми фіксувалися лише 1 раз у одному віці.

Для порівняння з личинкою диплоїдного гібриду LR були використані також 2 пуголовки двох вікових груп (8 і 11 доби розвитку), отриманих протягом схрещувань (відлов амплексусів і природне розмноження) гібридів з Добрицького ставка 2015 року (Дрогваленко диплом 4). Личинки були узяті з кладки, гомогенний склад якої (лише LR-особини) був підтверджений мікросателітним аналізом; мікросателітний аналіз також підтвердив геномну композицію LRR матері кладки R – у ході комплексу молекулярних досліджень у інституті Лозанни, Швейцарія (неопубліковані дані, Г. О. Мазепа).

Sex	Parents		Genotype	Genotype	Progeny Species	Code
	Species	Genotype				
F	<i>P. lessonae</i>	LL	LL	<i>P. lessonae</i>	L	
M	<i>P. lessonae</i>	LL	LL			
F	<i>P. ridibundus</i>	RR	RR	<i>P. ridibundus</i>	RR	
M	<i>P. ridibundus</i>	RR	RR			
F	<i>P. esculentus</i>	LRR	RR	<i>P. ridibundus</i>	R	
M	<i>P. ridibundus</i>	RR	RR			
F	<i>P. esculentus</i>	LLR	LLR	<i>P. esculentus</i> likely 3n	T1, T2	
M	<i>P. ridibundus</i>	RR	LLR			
F	<i>P. esculentus</i>	LRR	LR	<i>P. esculentus</i> 2n	LR	
M	<i>P. esculentus</i>	LR	LR			

Рисунок 4.1. Склад батьків та потомства, використаних у даному дослідженні. (за Drohvalenko 2021)

Пуголовки фіксувалися, починаючи з 2 дня розвитку: щоденно до досягнення 12-денного віку та що три дні ще три рази. Кладки T та T1 були фіксовані лише 1 раз (по 15 особин, вік 10 днів), диплоїдні гібриди були фіксовані лише раз (2 особини, вік 8 днів). Загальна кількість зразків: 362, більшість з кладок RR, L та R.

У пуголовків досліджувалися якісні (забарвлення та візерунок різних частин тіла) та кількісні ознаки (розміри та співвідношення різних частин тіла). Пуголовки обстежувалися та фотографувалися (з масштабним мірилом) під мікроскопом МБС-9 камерою TourCam AMA075 (з програмним забезпеченням TourView), фото аналізувалися та вимірювалися в програмі AxioVision (Carl Zeiss Vision). Частини тіла для вимірювання обиралися з точки зору їх доступності для обстеження (наприклад, [Altig 2007](#); [Haas і Das 2011](#); [McDiarmid і Altig 1999](#)) (Рис. 4.2).

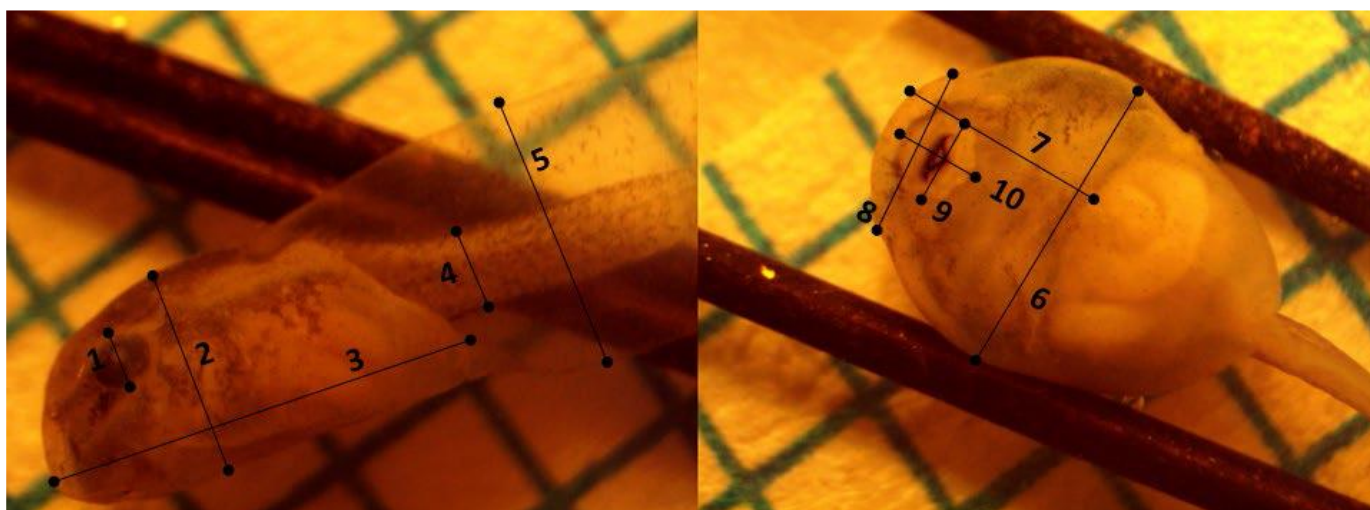


Рисунок 4.2. Використані проміри: 1 – висота ока (ОН), 2 – висота голови (НН), 3 – довжина тіла (ВЛ), 4 – висота хвостового м'яза (ТМН), 5 – висота хвоста (ТН), 6 – ширина голови (НВ), 7 – довжина голови (НЛ), 8 – міжочна дистанція (ІОВ), 9 – ширина рота (МВ), 10 – довжина рота (МЛ); межею голови вважалася межа букальної порожнини (за Drohvalenko 2021)

В якості якісних ознак було обрано п'ять особливостей забарвлення, кожен з яких, як виявилось, мав два чітко відмінні стани (Рис. 4.3):

- Забарвлення біляротових «присосок» (adhesive glands; залоз, що виділяють клейкий секрет, за допомогою яких личинка втримується на якійсь поверхні у потоках води; наявні, поки не розвинуться хвостовий плавець і ротовий апарат): світлі (А) або темні (В);
- Основний фон забарвлення тіла (не малюнок, а саме відтінок кольору поверхні тіла): світлий (А) або темний (В);
- Характер малюнку на спинній стороні тулуба: чіткі забарвлені сегменти (А) чи змазаний характер малюнку (В);
- Патерн на черевній частині тулуба: дугоподібний малюнок (А) чи змазаний однорідний фон (В);
- Забарвлення райдужки очей: бліда (А) чи яскрава (В).

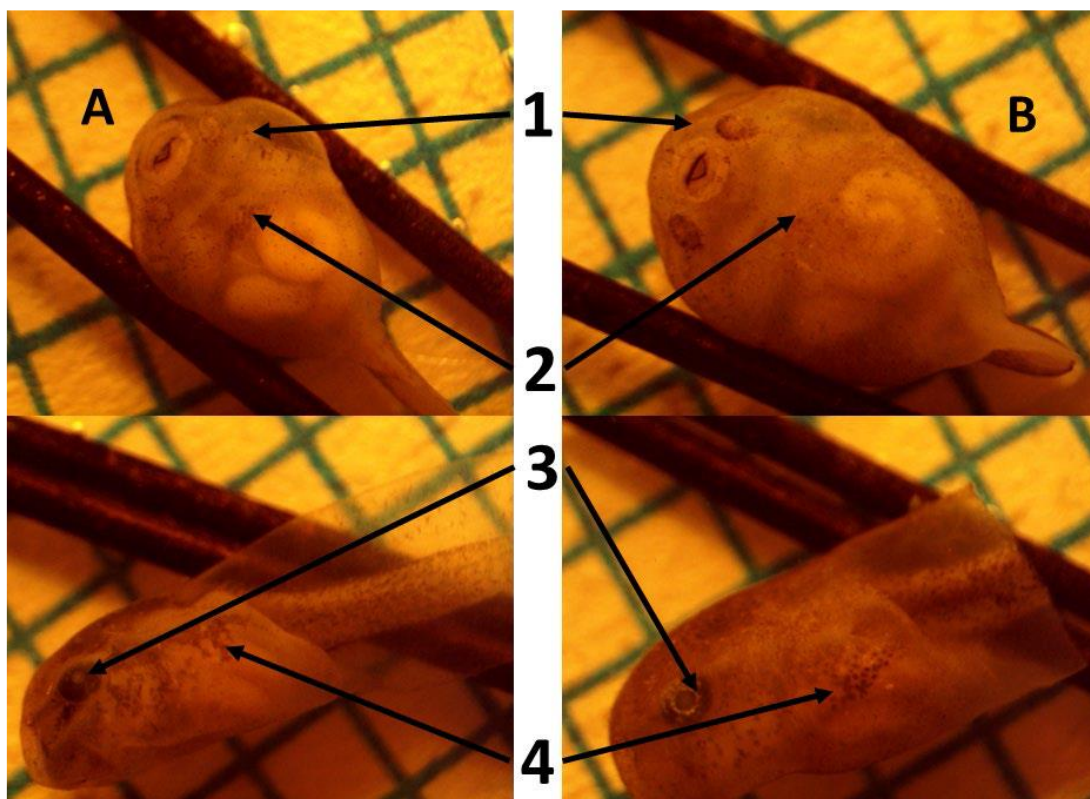


Рисунок 4.3. Якісні ознаки та їхні стани у досліджених пуголювків: забарвлення припосок (1), черева (2), райдужки (3), спини (4) (за Drohvalenko 2021)

Кожна з проаналізованих груп мала унікальну комбінацію станів зазначених ознак. Ці комбінації зближували групи з котроюсь з батьківських форм (*lessonae-/ridibundus-like*) – при цьому диплоїдні гібриди демонстрували проміжний (*intermediate*) варіант (Рис. 4.4).

Ці комбінації визначалися найкраще для пуголювків у віковому проміжку 6-10 днів: для старших пуголювків окремі ознаки забарвлення змазувалися, а для молодших могли ще не бути достатньо розвинутими. Наприклад, після 10 днів розвитку більшість пуголювків втрачало біляротові присоски – при цьому не обов'язково набуваючи нової стадії розвитку (Gosner 1960).

Feature	Group				
	L	T1+T2	LR	RR	R
Adhesive glands	Light	Light	Dark	Dark	Dark
Body background	Light	Light	Dark	Dark	Light
Back pattern	Clear	Clear	Blurred	Blurred	Blurred
Abdomen pattern	Clear arc	Plain	Clear arc	Plain	Plain
Iris brightness	Pale	Pale	Pale	Bright	Bright
Feature combination	'lessonae'-like		'intermediate'	'ridibundus'-like	

Рисунок 4.4. Морфологічні ознаки 6-10-денних пуголовків; нижній рядок відображає схожість груп на особин того чи іншого батьківського виду (за Drohvalenko 2021)

Результати вимірювання кількісних ознак для того самого вікового діапазону (6-10 днів) наведені у Рис. 4.5.

Group, age	Stage	HL	HH	OH	BL	TMH	TH	HW	IOW	ML	MW	
L	6	21-21	0.96-1.21	0.93-1.12	0.26-0.36	2.21-3.11	0.42-0.53	0.98-1.48				
	7	22-24	1.11-1.47	1.03-1.24	0.24-0.39	2.47-3.25	0.48-0.54	1.54-1.82				
	8	24-25	1.20-1.83	1.16-1.56	0.34-0.50	2.64-3.41	0.48-0.60	1.55-2.09	1.42-2.01	0.63-0.95	0.39-0.56	0.42-0.56
	9	25	1.44-1.76	0.95-1.38	0.28-0.43	2.50-3.09	0.48-0.59	1.45-1.94	1.81-2.14	0.67-1.00	0.42-0.60	0.52-0.61
	10	25	1.42-1.86	1.21-1.54	0.32-0.46	2.81-3.57	0.55-0.65	1.76-2.10	2.03-2.65	0.84-1.16	0.47-0.59	0.58-0.83
RR	6	20-22	0.89-1.25	1.02-1.22	0.26-0.43	2.87-3.40	0.38-0.50	0.94-1.49				
	7	21-23	1.23-1.46	1.14-1.31	0.3-0.41	3.00-3.50	0.34-0.63	1.31-1.75				
	8	23-24	1.34-1.68	1.14-1.51	0.34-0.46	2.73-3.00	0.52-0.66	1.55-1.97	1.48-1.94	0.74-0.96	0.32-0.48	0.35-0.52
	9	24-25	1.50-1.83	1.25-1.46	0.38-0.45	2.82-3.59	0.52-0.63	1.60-1.88	1.88-2.27	0.72-0.99	0.42-0.52	0.41-0.59
	10	25	1.68-1.88	1.38-1.52	0.40-0.49	3.31-3.75	0.55-0.72	1.60-2.07	2.10-2.56	1.06-1.16	0.40-0.57	0.57-0.71
R	6	20-22	0.97-1.21	1.05-1.36	0.29-0.39	2.90-3.47	0.37-0.58	1.07-1.80				
	7	20-24	1.03-1.43	1.22-1.36	0.30-0.43	2.67-3.25	0.39-0.63	1.21-1.99	1.64-1.73	0.83-0.87	0.35-0.45	0.37-0.48
	8	22-24	1.16-1.85	1.08-1.42	0.28-0.44	2.67-3.435	0.43-0.63	1.42-2.01	1.64-2.10	0.66-0.94	0.36-0.50	0.31-0.50
	9	24-25	1.29-1.90	1.23-1.44	0.37-0.43	2.70-3.24	0.52-0.64	1.46-1.95	1.61-2.31	0.81-1.10	0.40-0.54	0.43-0.60
	10	25	1.73-2.10	1.51-1.74	0.44-0.51	3.09-3.72	0.60-0.65	1.82-1.92	2.02-2.53	0.97-1.23	0.40-0.53	0.51-0.67
T1	10	24-25	1.25-1.55	1.20-1.40	0.33-0.43	2.54-2.86	0.51-0.61	1.50-1.96	1.41-1.87	0.55-0.83	0.36-0.48	0.40-0.50
T2	10	24	1.22-1.59	1.18-1.38	0.33-0.43	2.41-2.76	0.50-0.61	1.69-1.85	1.43-1.66	0.74-1.02	0.35-0.49	0.41-0.51
LR	8	23	1.30	1.38	0.41	2.92	0.59	1.64	1.76	0.93	0.44	0.51
	10	25	1.82	1.60	0.47	3.65	0.74	2.04	2.43	1.20	0.49	0.71

Рисунок 4.5. Діапазони значень метричних ознак, виміряних для усіх груп пуголовків в межах віку 6-10 днів. Діапазони наведені у вигляді min-max (мм). Відсутність значень означає неможливість надійно виміряти ознаку на екземплярах даного віку (за Drohvalenko 2021).

Для цього вікового діапазону був проаналізований зв'язок метричних ознак (та їхніх співвідношень) пуголовків з групою. Для цього був використаний

непараметричний дисперсійний тест Краскела-Уоліса, що мав виявити, за якими з обраних метричних критеріїв спостерігається значуща різниця між групами. Були проаналізовані лише групи L, RR та R як найчисельніші. Результати наведені у Рис. 4.6: виявилось, що після введення поправки Хольма-Бонфероні жодного дискримінуючого проміру не лишається після 7-денного віку.

Age, days	6	7	8	9	10
HL	0.457	0.077	0.498	0.275	0.224
HH	0.0003	0.0004	0.261	0.012	0.063
OH	0.087	0.913	0.626	0.008	0.231
BL	0.003	0.017	0.309	0.041	0.230
TMH	0.260	0.457	0.230	0.188	0.779
TH	0.089	0.428	0.703	0.996	0.467
HW			0.866	0.332	0.683
IOW			0.318	0.543	0.147
ML			0.012	0.597	0.068
MW			0.013	0.072	0.669
HL/HH	0.008	0.002	0.150	0.069	0.293
HL/HW			0.392	0.765	0.570
HH/HW			0.527	0.049	0.064
BL/HL	0.018	0.587	0.238	0.081	0.768
BL/HW			0.987	0.106	0.061
TMH/TH	0.459	0.336	0.005	0.132	0.087
ML/MW			0.030	0.759	0.505

Рисунок 4.6. Значення значущості результатів порівняння груп за окремими ознаками та їхніми співвідношеннями тестом Краскела-Уоліса. Жирним виділено значущості результатів порівнянь, що лишилися значущими після поправки Хольма-Бонфероні (за Drohvalenko 2021).

Також був застосований дискримінантний аналіз, аби виявити, які проміри придатні до розділення існуючих груп. Спочатку були проаналізовані найчисельніші групи: L, RR та R, – та всі проміри. Результати свідчили про значущість для розділення даних груп лише у промірів TMH, TH та IOW – без збігів з результатами тесту Краскела-Уоліса. На графіку, побудованому за двома першими канонічними коренями (Рис. 4.7, ліворуч), можна чітко бачити розділення пуголовків двох різних видів (L і RR+R).

Дискримінантний аналіз цих трьох груп разом з групами T та T1 лише у 10-денному віці продемонстрував значущість промірів HH, BL, IOW та MW – що частково збігається з результатами дисперсійного аналізу. На графіку

(Рис. 4.7, праворуч) перший канонічний корінь розділяє триплоїдів та диплоїдів, а другий розділяє два види.

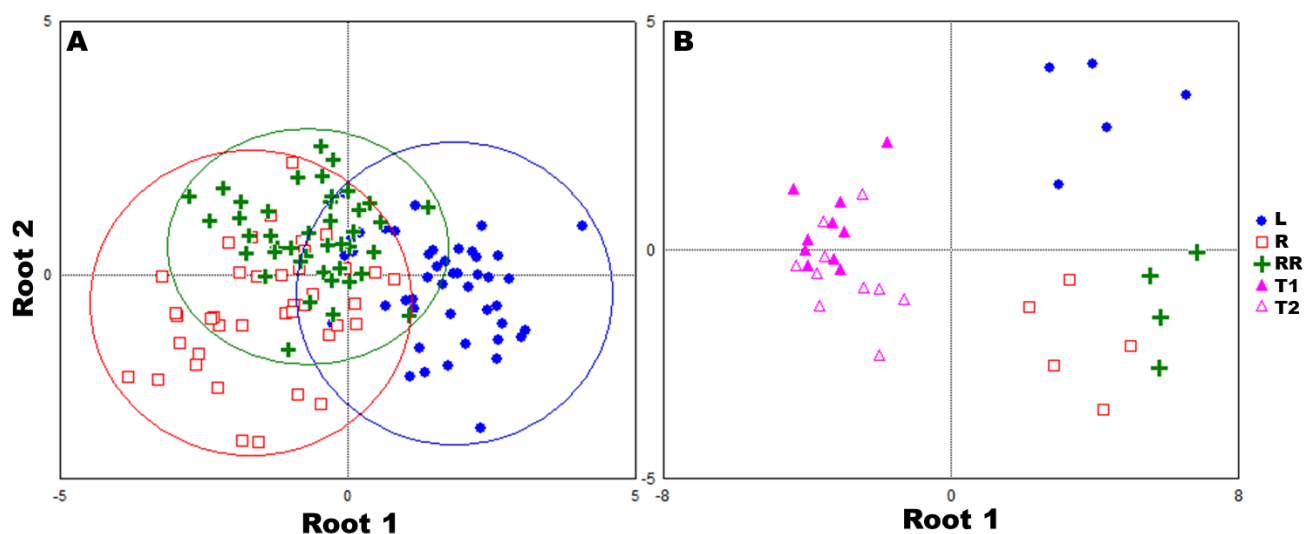


Рисунок 4.7. Положення особин на площинах двох перших канонічних коренів (за Drohvalenko 2021)

Аналіз головних компонент (PCA) також був застосований для того самого віку та промірів – але його результати дозволили розділити лише триплоїдів від диплоїдів (Рис. 4.8).

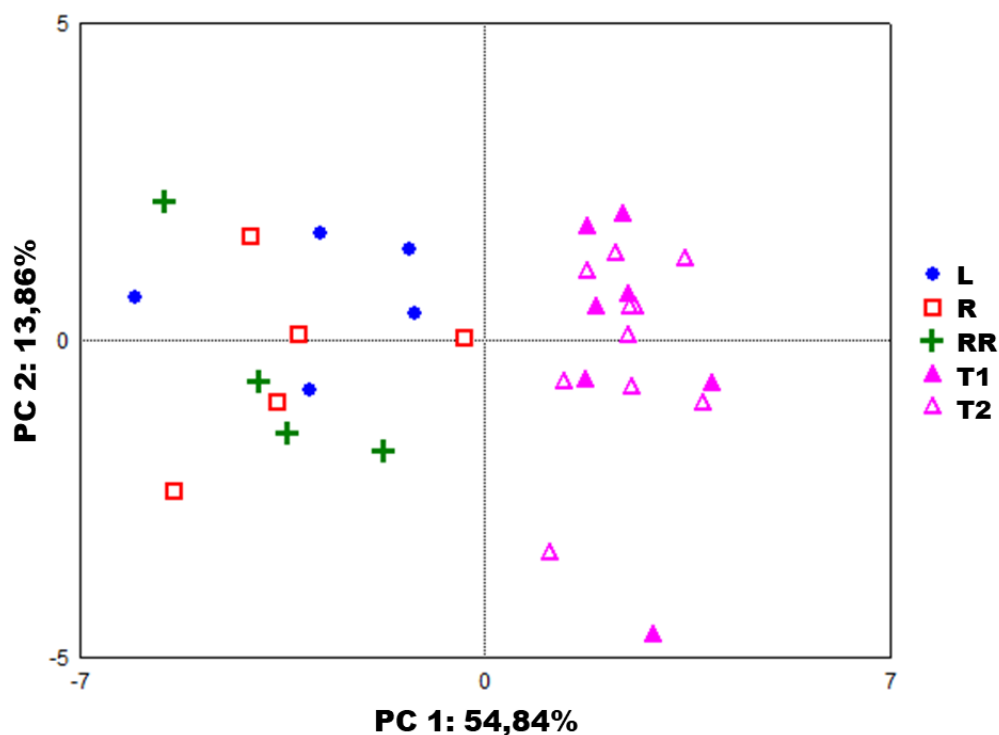


Рисунок 4.8. Положення особин на площині двох перших головних компонент (за Drohvalenko 2021)

В результаті було виявлено, що комбінації якісних ознак дозволяють розрізнити пуголовків на певному віковому проміжку, в той час як метричні ознаки дозволяють зробити це, лише будучи проаналізовані всі разом у багатовимірних тестах.

Джерело морфологічних відмінностей пуголовків різних видів та походження лишається неясним. Можливо, відмінності відображають екологічні відмінності займаних різними пуголовками ніш. Для пуголовків *P. esculentus* complex зареєстровані деякі метаболічні відмінності (Plenet, Hervant, i Joly 2000), що могло б вплинути на синтез пігментів або якось опосередковано на забарвлення. Деякі свідчення впливу пігментації на терморегуляцію були досліджені Rodríguez-Rodríguez, Beltrán i Márquez (2020) разом зі здатністю пуголовків змінювати фон свого забарвлення в залежності від фону оточення. На морфологічні ознаки також впливає взаємодія пуголовків з хижакami (J. V. Johnson et al. 2015; McCollum i Leimberger 1997). Існують також дослідження зв'язку забарвлення пуголовків з адаптивними та поведінковими особливостями (див. Thibaudeau i Altig 2012). Але, окрім того, що усі пуголовки в цьому дослідженні вирощувалися за однакових умов – пуголовки роду *Pelophylax* в цілому дуже близькі екологічно, і надійно припустити зв'язок їхніх відмінностей з екологічними умовами не видається можливим.

Морфологічні відмінності пуголовків можуть бути також онтогенетичними особливостями окремих видів. Дорослі особини різних видів мають достатньо відмінну морфологію (включно з забарвленням). Можливо, онтогенетичні процеси, що приводять до цих відмінностей, починаються ще на стадії пуголовка. До того ж, відомо, що морфологічні особливості зелених жаб, зокрема гібридів, пов'язані з «дозовим» ефектом геномів різних видів (Kierzkowski et al. 2011), тож наявність груп "*lessonae*"- та "*ridibundus*"- подібних комбінацій якісних ознак може бути підтвердженням такої гіпотези.

З цієї ж точки зору логічно виглядає проміжний варіант забарвлення у пуголовків-диплоїдних гібридів.

Групи пуголовків-озерних жаб (RR та R) виявилися схожими одна на одну за всіма якісними ознаками окрім однієї, що у групи R (озерні жаби-нащадки триплоїда) мала стан, характерний для групи пуголовків-ставкових жаб (світліше тіло). Це міг бути просто результат варіабельності цієї ознаки у озерних жаб. Але також відомо, що один зі своїх R-геномів ці пуголовки отримали від LRR-матері – яка сама, цілком ймовірно, мала серед батьків гібрида, що передав диплоїдні LR-гамети. Тож не виключено, що у ряду попередніх поколінь R-геном цих пуголовків гіпотетично міг зазнати рідкісної інтрогресії з L-генома, випадки якої відомі (наприклад, [Mikulíček et al. 2014](#); [Mazera et al. 2018](#); [Doležalková-Kaštánková et al. 2021](#)). І тоді ознака, характерна для пуголовків іншого виду, набуває пояснення.

Відмінність морфології кладок T та T1 може також бути наслідком генотипу, що зближає цих пуголовків зі ставковою жабою (вірогідно, LLR). Однак, дослідження розмноження самиць з Брусівки (наприклад, (Anna Fedorova і Pustovalova 2019) вказують на можливу присутність серед потомства також диплоїдів. Якщо досліджена вибірка складалася з самих триплоїдів – тоді можна припустити, що виявлені відмінності характерні для триплоїдів: наприклад, внаслідок більшого розміру клітин (Hermaniuk, Rybacki, і Taylor 2016) і, отже, змін у метаболізмі. Якщо ж досліджена вибірка включала і диплоїдів також – це б означало особливість розвитку саме зелених жаб у потомстві триплоїдів з Брусівки: їхній онтогенез і без того є дуже специфічним і включає суттєву запрограмовану загибель ряду форм (див. пункт 5.3.).

Видимість відмінностей лише завдяки багатовимірному аналізу не є чимось унікальним для пуголовків (див (M. Ilić 2016; Marija Ilić et al. 2019). Також не можна ігнорувати потенційну мінливість між різними популяціями (Zhao et al. 2017).

4.4. Аномалії розвитку зелених жаб

4.4.1. Гетерохронія метаморфів з ГПС Іськова ставка

Дорослі ознаки набуваються безхвостими амфібіями, що мають личинкову стадію – пуголовка, – через процес метаморфозу. Фінальний етап метаморфозу полягає у глобальній перебудові скелету пуголовка, його внутрішніх органів та структури шкіри; хвіст пуголовка при цьому резорбується, а весь організм суттєво втрачає у масі – переважно через втрату води (Brown і Cai 2007). В цей час особина не здатна харчуватися і перебуває у вразливому стані – і саме тому вкрай важливо, аби процес метаморфозу проходив злагоджено і швидко. Етап метаморфозу, судячи з усього, є також фактором добору у геміклональних популяційних системах (наприклад, Abt Tietje і Reyer 2004).

Протягом щорічного моніторингу в Іському ставку (див. пункт 3.6 та 5.1; Drohvalenko, Pustovalova, і Fedorova 2019) в липні 2021 році було піймано два незвичайних метаморфи (Рис. 4.9). Судячи зі ступеню розвиненості їхніх черепів, вони мали стадію 45 за Gosner (1960) – але обидві особини мали довгий вельми розвинутий хвіст, який в класичному випадку мав би почати резорбуватися ще на етапі 41 стадії, коли з'являються передні лапи та починає змінюватися голова (Shi 2000).

При цьому, незважаючи на більш примітивні риси онтогенезу, ці особини мали і доволі прогресивні. Довжина SVL їх сягала 28.2 та 29.7 мм, а хвости були приблизно у 1.5-2 рази довші (точно не виміряні). Типовий розмір цьогорічок (щойно метаморфозувалих) зелених жаб сягає ~17-20 мм для *P. lessonae* та 18 мм для *P. ridibundus* (Terentiev 1950; Pysanets 2014; Tkachenko 2019). Середній розмір штучно виведених цьогорічок з Журавлівського гідропарку (див. пункт 5.4) становив 18.2 мм (*P. ridibundus* та *P. esculentus* разом), а цьогорічок LLR-*P. esculentus* з виводку пари з Кременної (див. пункт 5.3) становив лише 17.1 мм. Схожі розміри були описані для цьогорічок з диких популяційних систем у Польщі (Leszek Berger і Berger 1992). Загальний габітус та пропорції двох обговорюваних особин також більше нагадували

сформованих ювенілів більше, ніж метаморфів: навіть забарвлення спини та стегон було незвично розвинуте, що буквально дозволило визначити їх як *P. esculentus* (Plötner 2005). Мікросателітний аналіз (локуси вказані в пункті 5.3) підтвердив видове визначення, встановивши, що один з метаморфів був диплоїд, а інший триплоїд (з генотипом LRR). Метаморфи згодом були відпущені, тож стать (за морфологією гонад) не визначалася.



Рисунок 4.9. Незвичні метаморфи з Іськова ставка, визначені як диплоїдний (ліворуч) та триплоїдний (праворуч) *P. esculentus* (за Drohvalenko, Fedorova, і Pustovalova 2022)

Феномени і гігантських пуголовків, і гігантських метаморфів у представників роду *Pelophylax* були зареєстровані у різних частинах ареалу *Pelophylax esculentus* complex (від Франції та Пн Європи до центральної Азії). Розмір деяких з описаних пуголовків перевищував 100 мм, а SVL гігантських цьогорічок з-під Познані сягала 28.9–32.8 мм (L. J. Vorkin, Berger, і Gunther 1981). Sovaciu-Marcov et al. (2003) описував гігантських пуголовків *Pelophylax* з термальних джерел. Gueh' et al. (2001) повідомляв про гігантських пуголовків з гарно розвиненим забарвленням серед потомства *P. esculentus*.

Вплив умов (зокрема, температури) розвитку на розміри і виживаність потомства зелених жаб різного генотипу свідчить про більший успіх, але менші розміри гібридних метаморфів (Nicolas B. M. Pruvost, Hollinger, і Reyer 2013). Метаморфи з Іськова ставка, спостережені тут раніше, мали типові пропорції і не мали настільки просунутого забарвлення (Рис. 4.10).



Рисунок 4.10. Метаморфи з Іськова ставка, піймані у липні 2016 року: невизначеного виду, але типової морфології для своєї стадії розвитку

Фактори гігантизму пуголовків лишаються не встановленими, не зважаючи на масу робіт на цю тему – так само, як і фактори середовища, що зумовлюють весь розвиток (Shi 2000). У 2021 році нерестовий сезон почався порівняно пізно (в червні, тоді як більш типово в травні) – отже, пролонгований розвиток можна виключити. Іськів став цвів та підсихав кілька разів за останні кілька років – це суттєво знижує ймовірність зимівлі пуголовків, а відтак їх надмірного росту. В будь-якому разі, висихання водойми здатне скоріше прискорити розвиток пуголовків, аніж порушити його хід чи злагодженість (Robert J. Denver, Mirhadi, і Phillips 1998). Велика ймовірність ролі внутрішніх факторів у регулюванні початку та строків метаморфозу: тиреоїдних та стероїдних гормонів, пролактину (Robert John Denver 1997; Hayes 1997b; 1997a; Rot-Nikcevic і Wassersug 2003; Brown і Cai 2007; Vitt і Caldwell 2014).

Втім, спостережуване явище не вкладається в феномени ані «гігантизму пуголовків» – для яких часто застосовується термін «arrested development» (Rot-Nikcevic і Wassersug 2004), – ані гігантизму цьогорічок. Досліджувані метаморфи, перш за все, демонструють накладені риси метаморфічної та пост-

метаморфічної тварини, ювеніла. А отже цей випадок варто класифікувати як збіг «гетерохронії послідовності» (sequence heterochrony) та «гетерохронії росту» (growth heterochrony) – подібні до описаних для видів роду *Pseudis* (M. Fabrezi, Quinzio, i Goldberg 2009; Marissa Fabrezi, Quinzio, i Goldberg 2010; Marissa Fabrezi 2011).

Цілком логічно буде припустити, що гетерохронія у розвитку цих двох особин пов'язана з їхнім гібридним походженням. Система Іськова ставка є складною (див. підпункт 5.3.7), а її динаміка включає в собі процеси елімінації певних генотипів (див. пункт 5.1), що не до кінця вияснені. Обидві особини незвичних метаморфів були гібридами, що відрізнялися за плоідністю. В цьому ж регіоні подібне явище гетерохронії було також зареєстроване для пуголовків часничниці Паласа, *Pelobates vespertinus* (Pallas, 1771) (Mykola Drohvalenko, Fedorova, i Pustovalova 2022). І саме через цей регіон також проходить гібридна зона з іншим видом, часничницею звичайною, *P. fuscus* (Laurenti, 1768) (Dufresnes, Strachinis, Tzoras, et al. 2019; Dufresnes, Strachinis, Suriadna, et al. 2019). Видова чи гібридна приналежність зареєстрованих метаморфів часничниць, втім, не була встановлена. Судячи з отриманих молекулярних та популяційних даних, обидві ці форми (LR- та LRR-*P. esculentus*) є, вірогідно, об'єктами для (часткової) елімінації з системи Іськова ставка (підпункт 5.1.1). З іншого боку – більший розмір після метаморфозу (за умови його завершення) сприяє більшій виживаності особин зокрема у зелених жаб (Altwegg i Reyer 2003). Тож це порушення раннього розвитку може гіпотетично розглядатися як прояв дії різних механізмів.

Окрім численних зовнішніх (екологічні умови середовища) та внутрішніх (гормональні порушення) факторів, що могли вплинути на незвичний хід розвитку цих гібридів, не варто також виключати можливий адаптивний потенціал таких змін. Пластичність розвитку є одним з рушійних механізмів еволюції, в тому числі у філогенезі амфібій (наприклад, Roelants, Haas, i

Bossuyt 2011), тож подібні процеси можна вкрай обережно припустити і для мікроеволюції всередині ГПС, а надто такої унікальної як ГПС Іськова ставка.

4.4.2. Вади розвитку цьогорічок з ГПС Добрицького ставка

Серед аномалій розвитку безхвостих амфібій одними з найбільш поширених є аномалії розвитку кінцівок (Meteyer 2000; Ballengée і Sessions 2009). У одній окремії ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття, відомій своїм багатим складом генетичних форм (пункт 3.6) – ГПС Добрицького ставка, – була зареєстрована незвично висока кількість цьогорічок з подібним набором аномалій розвитку кінцівок.

Восени 2018 року вибірка з 29 цьогорічок зелених жаб була зібрана на Добрицькому ставку. Видова приналежність цьогорічок не так надійно визначається за зовнішньою морфологією (Kierzkowski et al. 2013), як у дорослих, тому всі особин цієї вибірки вважалися просто представниками зелених жаб *Pelophylax*. Стать була встановлена за морфологією гонад; плідність була встановлена за допомогою каріології метафазних пластинок з епітелію кишечника та/чи кісткового мозку (Macgregor і Varley 1988).

Термінологія для позначення аномалій розвитку недосконала. Надалі тут аномалії будуть називатися згідно з Nekrasova (2008): наприклад, відсутність частини кінцівки є «ектромелією», вкорочена кінцівка – «гемімелія», а порушена будова кінцівки – «таумелія».

Проаналізована вибірка складалася з 16 самиць та 13 самців, різниця часток статей незначуща ($p = 0.56$; Fedorova, Drohvalenko, і Pustovalova 2018). З них 7 особин (5 самиць та 2 самця) мали ознаки серйозних порушень розвитку кінцівок: 5 мали ектромелію, 1 мав гемімелію, а одна особина мала комбінацію з гемімелії та таумелії (Рис. 4.11).



Рисунок 4.11. Цьогорічки зелених жаб з порушеннями розвитку задніх кінцівок: А-Е – ектромелія, F – гемімелія, G – гемімелія з таумелією (стрілка); стать зазначена на зображеннях (за Fedorova, Pustovalova, i Drohvalenko 2023)

Розподіл порушень виявився незначуще пов'язаним зі статтю цьогорічок ($\chi^2 = 0.2074$, $p = 0.6488$) (Fedorova, Pustovalova, i Drohvalenko 2023).

Варто відмітити, що для ГПС Добрицького ставка раніше проводився облік аномалій серед дорослих зелених жаб (Kryvoltsevych et al. 2022). В його ході (вибірка у 190 особин) було виявлено лише 1 особину з втраченою кінцівкою та 1 особину з таумелією – більшість виявлених аномалій стосувалася порушень розвитку пальців (таких як брахідактилія чи синдактилія), а також порушення типового забарвлення (форма дорзомедіальної смуги) чи м'язова дистрофія (неясного генезу). Частота порушень розвитку цілої кінцівки відтак, значуще відрізнялася між дорослими та цьогорічками (точний тест Фішера, $p < 0.0001$). Також очевидно, що більшість аномалій, виявлених серед дорослих, набагато менше знижує життєздатність тварин, аніж аномалії, виявлені серед цьогорічок.

Джерел появи таких аномалій може бути кілька. Чинниками, що сприяє виникненню морфологічних порушень, можуть бути як природні (паразитичні інфекції, травми, надмір УФ-випромінювання), так і антропогенні (хімічні забрудники) (P. T. J. Johnson et al. 1999; Oulett 2000; Henle, Dubois, і Vershinin 2017). Травми, окрім випадкових, можуть бути наслідком високого рівня хижацтва у конкретній водоймі – наприклад, типовим нападником для пуголовків і метаморфів є личинки бабок (Ballengee і Sessions 2009). Подальший ступінь порушення залежатиме від стадії розвитку пуголовка, на якій відбулася травма, і, отже, потенціалу до регенерації.

Але не варто також забувати про генетично-детерміновані фактори. Те ж дослідження аномалій серед дорослих жаб (Kryvoltsevych et al. 2022) виявило набагато меншу (в 4.2 рази) частоту аномалій в ГПС Корякова ставка (див. пункт 3.6), частина з яких також припала на забарвлення. Дослідження цьогорічок в Коряковому ставку (пункт 5.2) не виявило помітної частки особин з аномаліями. Відсутність дорзомедіальної полоси також була спостережена у 1 гібрида з ГПС р. Псел (підпункт 3.3.3).

ГПС Добрицького ставка складна і відрізняється від двох згаданих систем як мінімум високою часткою триплоїдів у своєму складі (пункт 3.6; Meleshko, Korshunov, і Shabanov 2014). Але дослідження плідності даної вибірки цьогорічок продемонструвало, що всі 29 є диплоїдами (Fedorova, Drohvalenko, і Pustovalova 2018). Припускається, що висока частка триплоїдів серед дорослих є результатом елімінації деякої частки диплоїдних особин впродовж їхнього онтогенезу (можливо, гібридолізних *P. ridibundus*). Таку версію почасти підтверджує раніше дослідження плідності пуголовків з ГПС Добрицького ставка (Fomenko et al. 2017) що також не виявило триплоїдів у вибірці з 42 особин.

Висока частка суттєво знижуючих пристосованість порушень онтогенезу серед диплоїдного молодняка може бути розглянута як один з механізмів, що підтримують сталий склад ГПС Добрицького ставка. Втім, достатньо

непрямих доказів, аби вважати, що нестабільність розвитку загалом притаманна зеленим жабам з даної ГПС (проблеми зі згортанням крові та поширеність нелетальних аномалій серед дорослих тварин; Kryvoltsevych et al., 2022). Такі особливості слід вважати локальним генетичним чинником, пов'язаним, ймовірно, з ізолюваністю і складністю системи.

4.4.3. Аномалії розвитку у ГПС Кременної та Брусівки

ГПС в околицях м. Кременна та с. Брусівка відрізняються своїм незвичайним складом та унікальними процесами добору серед нащадків гібридів. Триплоїдні самиці LLR-*P. esculentus* в цих системах є єдиною гібридною формою, що співіснує з представниками *P. ridibundus*. Особливості їхнього відтворення розглянуті у пункті пункт 5.3.

Серед експериментально отриманих пуголовків у потомстві гібридної самиці та самця озерної жаби з ГПС Брусівки були виявлені диплоїдні та триплоїдні гібриди обох статей. Однак, для 1 пуголовка, ідентифікованого з використанням мікросателітного аналізу та видоспецифічних SNP як LLR-триплоїда, каріологія метафазних пластинок виявила мозаїчність. Тобто, серед забарвлених (за допомогою AgNO_3) та проаналізованих пластинок зустрічалися як диплоїдні, так і триплоїдні (Anna Fedorova і Pustovalova 2019).

Результати експериментів з штучними схрещуваннями дали підставу припускати два шляхи відтворення LLR-самиць у таких системах: продукування одразу суміші L- та LL-гамет і подвоєння L-геному з L-гамет у деяких ікринках після запліднення. На користь першої гіпотези свідчать відомі випадки такого гаметогенезу серед LLR-гібридів та гетерозиготність кількох дорослих особин.

На користь другої свідчить теоретична можливість подвоєння геномів за дії певних фізичних факторів, що пригнічують відокремлення полярного тільця від ооцита, переважно спостережуваних лабораторно (див. пункт 5.3). Але пуголовок з сумішшю клітин різної плоїдності (Рис. 4.12) також може бути непрямим свідченням процесу зміни плоїдності організму в ході онтогенезу.

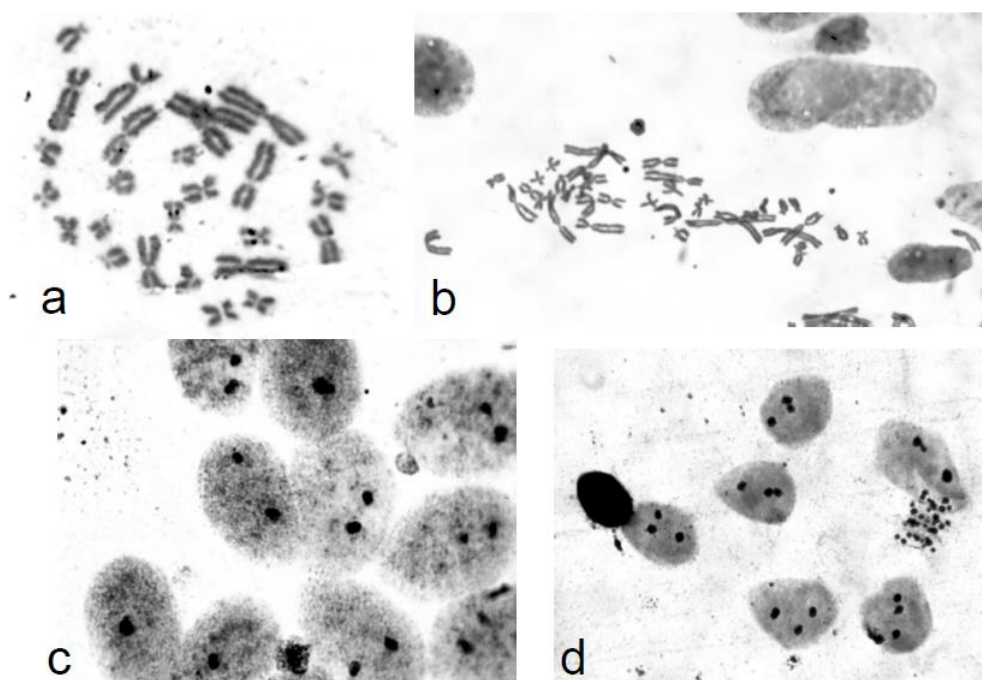


Рисунок 4.12. Метафазні пластинки та інтерфазні ядра диглоїдних (а, с) та триплоїдних (b, d) клітин (за Fedorova і Pustovalova 2019)

Схожий випадок мозаїцизму, але з гаплоїдними та триплоїдними еритроцитами, було зареєстровано для потомства від схрещування *P. esculentus* та *P. lessonae* (Leszek Berger і Ogielska 1994). Автори пояснили це феноменом аномального поділу вже подвоєних геномів під час першого поділу зиготи, що створило два бластомери з неоднаковими наборами хромосом. Подібний механізм міг би лежати в основі процесів, що спостерігаються в ГПС Брусівки – формування триплоїдного потомства у гібридної форми, яка в інших ГПС ймовірніше передає гаплоїдні гамети (Biriuk et al. 2016). Варто додати, що мозаїцизм спостерігався також і у ГПС заплави Сіверського Дінця – також у пуголовків, що дало підстави припустити їхню подальшу загибель (Михайлова 2011).

Тож, гіпотетично, процеси, що відбуваються на найбільш ранніх етапах онтогенезу (незадовго після запліднення), можуть сприяти формуванню саме тої структури та динаміки, яка підтримує сталий склад такої незвичної ГПС як у Брусівці.

Для експериментального потомства LLR-самиці з Кременної мозаїчних особин виявлено не було. Однак на цій, більшій кладці, були зареєстровані інші онтогенетичні феномени.

Наприклад, гальмування у розвитку (Rot-Niksevic і Wassersug 2004) частини пуголовків. Більша частина потомства завершила свій метаморфоз двома «хвилями»: за проміжки у 70-77 днів та 91-104 дня, – маючи типовий розмір для цьогорічок – 17.06 мм (12.7-19.0 мм). Але 10 нащадків лишалися на різних стадіях розвитку пуголовків (30-44) аж до віку у 78-94 дня, так і не пройшовши повний метаморфоз. Усі вони мали генотип LLR. Характерно, що серед таких «завислих» у розвитку особин було вдвічі більше самців – можливо, ускладнений метаморфоз є одним з механізмів елімінації особин цієї статі з пулу нащадків. Подібний процес затримки в розвитку спостерігався для частини експериментального потомства диплоїдного самця *P. esculentus* та самиці *P. ridibundus* з ГПС Журавлівського Гідропарку (пункт 5.4), де таким чином елімінувалися особини батьківського виду.

Цікаво відмітити потрапляння обидвох одиничних представників відсутніх серед дорослих форм (LLR-самця та LR-самиці) у першу «хвилю» метаморфів. Загалом же, 2 особини з генотипом LR були зареєстровані серед ранніх пуголовків – на стадіях 25 та 30, – які мали помітні вади розвитку (деформація тіла та/або помітна слабкість). Тож, ймовірно, для елімінації різних форм (генотипів, статей) у ГПС Кременної діють різні механізми на різних етапах онтогенезу.

4.5. Фенологічні аномалії зелених жаб

Характер стійкого співіснування і взаємодії декількох видів – а саме це являють собою геміклональні популяційні системи, – має суттєво залежати від екологічних особливостей кожного з них. Вже відомо, що онтогенетичні стратегії у зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex задають їх різну

поведінку, темпи росту, вклад в потомство і режим розмноження (Е. Е. Usova 2010; D. A. Shabanov et al. 2014; О. Е. Usova, Kravchenko, і Shabanov 2015; D. Shabanov et al. 2015). Вірогідно, фактори середовища задають не менш суттєві обмеження на прояв тої чи іншої поведінки в житті кожного з видів – як-от нерест, пов'язаний у часі (у більшості видів амфібій) з підвищенням температури та вологістю (наприклад, Duellman і Tueb 1986). Цей вплив, в свою чергу, має залежати від характеру їхньої екологічної пластичності (Wells 2007).

Пластичність розмноження та онтогенезу потомства можна непрямим чином оцінити за фенологією цих процесів. Для українських видів зелених жаб відомі типові строки нересту та темпи розвитку (Писанець 2007; Pysanets 2014). Однак, окремі спостереження свідчать про здатність цих видів регулювати навіть ці процеси.

Наприклад, строки нересту у озерної жаби *P. ridibundus* на всій протяжності її ареалу зазвичай вкладається у проміжок між квітнем та червнем. Розвиток пуголовків починається одразу після запліднення та займає 2-3 місяці (Pysanets 2014).

Однак, на острові Хортиця (р. Дніпро, м. Запоріжжя) був зареєстрований незвичний феномен. В першій декаді серпня (06-08.08.2020) на піщаному узбережжі та у озерах плавнів острова були в масі спостережені пуголовки *P. ridibundus* (як єдина форма зелених жаб на острові; підпункт 3.2.1) одночасно на багатьох різних стадія розвитку. Окрім зовсім молодих цьогорічок та метаморфів, майже завершивших метаморфоз, увагу привернули пуголовки на середніх етапах розвитку (~37 стадія за Gosner 1960) та зовсім маленькі пуголовки ще навіть без зачатків задніх кінцівок (Рис. 4.12).

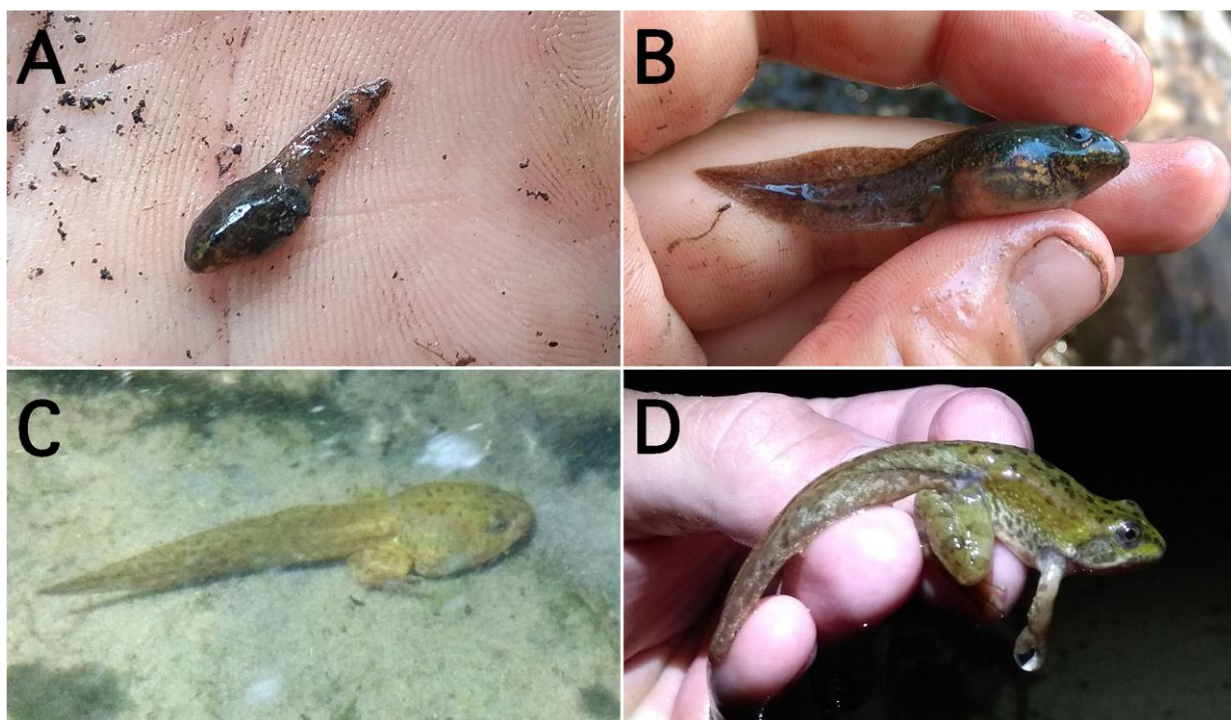


Рисунок 4.13. Серпневі пуголовки *P. ridibundus* з о. Хортиця на різних етапах розвитку: А – ранній пуголовок, В – середнього розвитку пуголовок, С – ранній метаморф, D – пізній метаморф (за [Drohvalenko 2021](#))

Якщо прийняти 2-3 місяці за типовий строк розвитку озерних жаб, то нерест, що породив найбільших особин пуголовків, мав би статися в травні, а найменших – аж в пізньому липні! Це явно може вважатися розтягнутою «верхньою» межею строків розмноження.

Інші непрямі докази розтягнутості розмноження зелених жаб були отримані опортуністичним чином з 2020 по 2023 рік.

У Добрицькому ставку (пункт 3.6) в 2020 році було зареєстровано самицю *P. esculentus*, яка ще не віднерестилася і була повна ікри, у перших числах липня (03.07.2020). Наявність ікри була визначена прямим чином: самиця скинула її в лабораторії.

На розтягнутість нересту також можуть вказувати пізні знахідки пуголовків чи метаморфозуючих особин восени. Так, в штучному ставку на лівому березу р. Жихорець (підпункт 3.5.4) 28 вересня 2020 року були знайдені вельми маленькі метаморфи зелених жаб останніх стадій, що зберігали залишки

хвостів. З Лозівського району надходили свідчення (приватні повідомлення, підкріплені фото) про наявність як пуголовків середніх стадій розвитку, так і метаморфів зелених жаб 15-25.09.2022 року. З околиць Фастова (Київська область) також надходили свідчення (приватні повідомлення, підкріплені фото) про пуголовків зелених жаб середніх стадій розвитку 19.09.2023 року.

Також, вже 19.06.2020 році у заплаві річки Уди (урочище «Трикутник»; підпункт 3.5.4) був зареєстрований вельми крупний пуголовок зеленої жаби середніх стадій розвитку. У 2023 році перші середні пуголовки (ще 26-30 стадії розвитку, без помітних кінцівок) були зареєстровані у НПП «Слобожанському» (підпункт 3.3.4) вже 09 червня. Цього ж року, 01 липня у штучному ставку в долині р. Лопань біля с. Мала Данилівка (підпункт 3.5.3) були зареєстровані великі пуголовки зелених жаб з розвинутими задніми кінцівками. Такі темпи розвитку цілком відповідають типовому нересту, що відбувся з початку до кінця травня.

Вкупі ці дані свідчать про, ймовірно, розтягнуте у часі вперед розмноження зелених жаб в Україні – або, принаймні, про їхню схильність до такого. Єдиної гіпотези про джерело кожного конкретного зареєстрованого феномену назвати важко.

Ознаки пізнього нересту могли б бути аналогічними ознакам затягнутого розвитку пуголовків – приміром, викликаного перенаселенням і високою щільністю особин у водоймі (Leszek Berger 2008). Але ті ж пуголовки на о. Хортиця були зареєстровані в руслі та обширних заплавах великої річки Дніпро; згадані водойми в Харківській області не є мілкими, а частина є навіть частково проточними.

Кліматичні дані надають деякі підказки. Глобальний температурний моніторинг демонструє, що травень 2020 року був відносно прохолодним та вологим, з численними опадами (див. графіки Copernicus Climate Change Service у Drohvalenko 2021), що не могло не вплинути на шлюбну поведінку зелених жаб – враховуючи температуру води, що становила близько 15° С,

тобто нижню межу екологічних вимог для зелених жаб (Pysanets 2014), зсув розмноження навіть не виглядає дивним. З іншого боку, найменші пуголовки – продукт, гіпотетично, найпізнішого нересту, – зустрілися у заплавних озерах, що мали б бути найтеплішими водоймами в районі Хортиці. Для зелених жаб і озерних жаб зокрема пізній нерест є відомим, і навіть повідомлялося про зимову активність – але переважним чином біля теплих водойм електростанцій (Bogdan et al. 2011; Fominykh і Lyarkov 2012). А ось пізній нерест чи іншим чином затягнутий розвиток у природних водоймах може призвести до смертності від холоду серед личинок, що не пройшли метаморфоз. Інша кліматична гіпотеза полягає у теплій зимі, як-от у 2020 році (див. графіки Copernicus Climate Change Service у Drohvalenko 2021). За надто теплої і сухої зими жаби не здатні оптимальним чином переносити зимівлю, а отже змушені витратити більше часу весною для приведення організму до режиму розмноження (Carey і Alexander 2003).

Подовжені сезони розмноження, вірогідно, формуються декількома факторами одночасно, серед яких важко виділити основний. Здібності зелених жаб витримувати кліматичні коливання вивчалися або у ізольованих ставках (наприклад, Llorente, Montori, і Richter-Boix 2006), або в умовах посухи (Todd et al. 2011; Walls, Barichivich, і Brown 2013), що не застосовуване до описаних випадків.

Чи пов'язаний феномен затягнутого розмноження гібридної самиці з Добрицького ставка з особливостями його ГПС – питання лишається відкритим. Більшість інших описаних пізніх реєстрацій потомства включала в себе зустрічі метаморфозуючих особин, що, вірогідно, виключає вплив зупинки розвитку як фактору добору у ГПС (див. цей розділ вище).

Змінена фенологія зелених жаб може глобальним чином впливати на структуру і динаміку ГПС. Представники *P. ridibundus* вже є інвазивним видом у частині Європи, що в тому числі втручається у місцеві популяції зелених жаб та ГПС (Holsbeek і Jooris 2010; Leuenberger et al. 2014; Dufresnes et al. 2017;

Litvinchuk et al. 2020) зміни ареалу спостерігалися і для інших видів *Pelophylax* (Dufresnes і Dubey 2020). Це цілком може статися і на наших теренах. Прояв здатності розтягувати власне розмноження може стати рушійною силою зміни характеру парувань в популяційних система – наприклад, за рахунок рознесення у часі нересту різних форм. Це, в свою чергу, може змінити набір потомства, що залежить від гаметогенезу батьківських форм, і врешті склад всієї системи.

4.6. Розміри тіла та еритроцитів як маркер онтогенезу

4.6.1. Розміри тіла і еритроцитів у дорослих жаб

Для тих самих п'яти ГПС Харківської області, для яких був досліджений склад трьох форм зелених жаб та його динаміка з часом (пункт 3.6), був досліджений розподіл середньої довжини еритроцитів та довжини тіла (SVL) у жаб різної плоідності або виду, різних форм ($2n$ і $3n$ *P. esculentus* та *P. ridibundus*) та з різних ГПС, в тому числі за весь період їхнього моніторингу (Рис. 4.14).

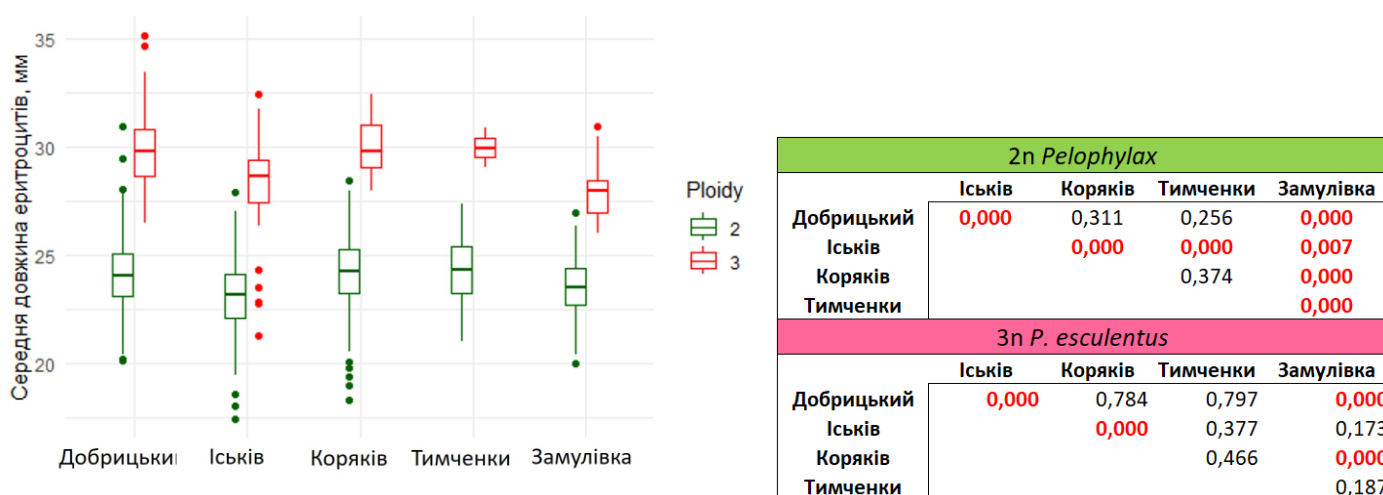


Рисунок 4.14. Розподіл довжини еритроцитів у зелених жаб різної плоідності в різних локалітетах (ліворуч); попарне порівняння (тест Дана) цих довжин у жаб обох плоідностей між різними ГПС (праворуч); р значущих різниць виділено червоним

Дисперсійний тест (Краскела-Уоліса) продемонстрував, що середні значення еритроцитів значуще відрізняються у зелених жаб з різних ГПС – і порівнювані разом, і порівнювані окремо диплоїди та триплоїди ($p < 0.001$). Найбільш відмінними серед диплоїдних еритроцитів виявилися еритроцити зелених жаб з Іськова ставка та Замулівки. Триплоїдні еритроцити були більш подібними – менша кількість значущих відмінностей зареєстровано (Рис. 4.14).

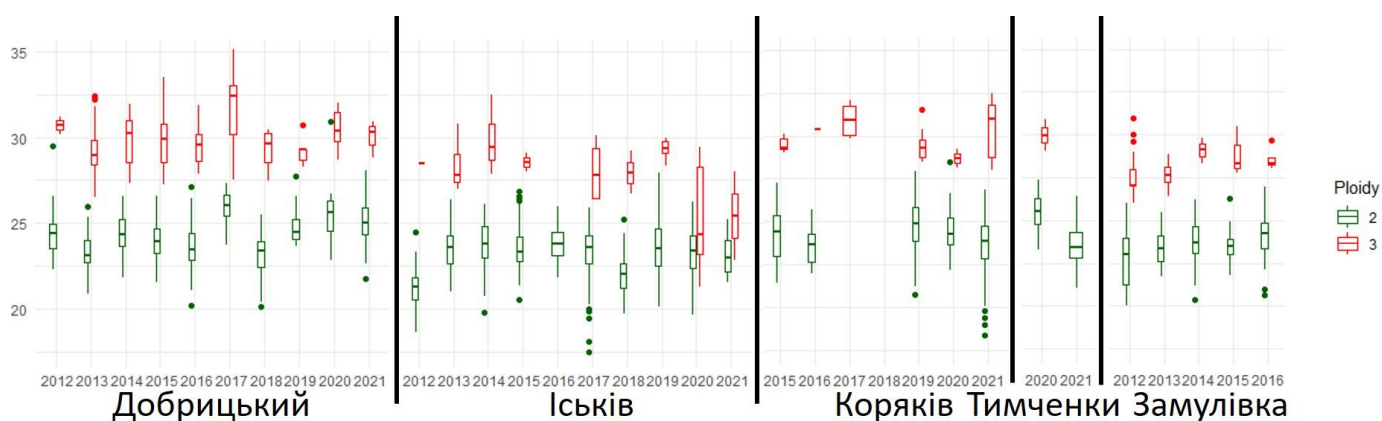


Рисунок 4.15. Мінливість розміру еритроцитів у кожній ГПС впродовж років дослідження

Аналіз мінливості середнього розміру еритроцитів по роках у кожній окремій системі продемонструвало, що розмір диплоїдних еритроцитів варіює значуще всюди ($p < 0.05$). Але розмір триплоїдних еритроцитів виявився значуще мінливим лише у ГПС Замулівки ($p = 0.028$) та Добрицького ставка ($p = 0.043$, на межі значущості), в той час як у Коряковому та Ішковому ставках він, судячи з усього, лишався порівняно стабільним ($p = 0.109$ та 0.106 , відповідно). В Тимченках дорослі триплоїди були знайдені лише одного року, тому матеріалу для порівняння не було (Рис. 4.15). Значне перекриття діапазонів розміру диплоїдних та триплоїдних еритроцитів у ГПС Іськова ставка в 2020-2021 роках відображає перші реєстрації окремих триплоїдів з маленькими еритроцитами (неопубліковані дані).

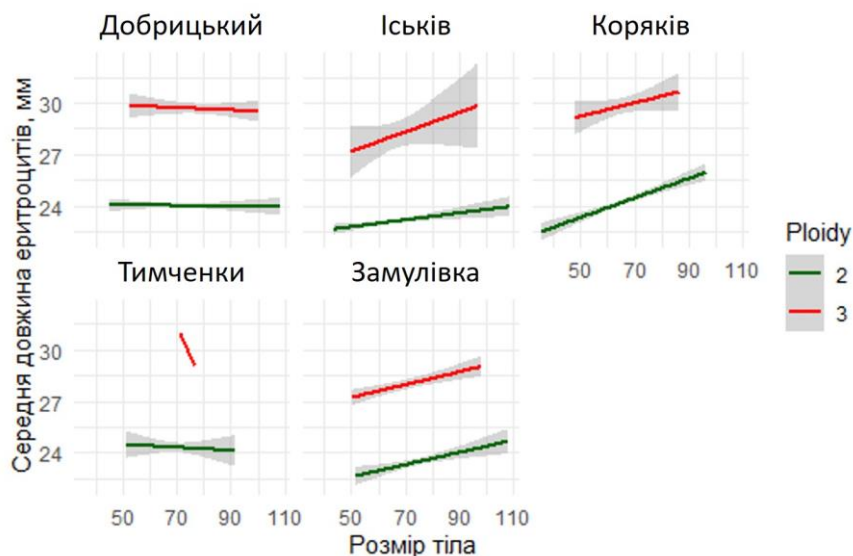


Рисунок 4.16. Мінливість регресії для розмірів еритроцитів та тіла для зелених жаб з кожної ГПС

Кореляція довжини диплоїдних еритроцитів з SVL (Рис. 4.16) виявилася значущою (хоча і слабкою), лише у Іському і Коряковому ставках та в Замулівці ($p=0.002$, 0.001 та 0.001 , відповідно). Аналогічна кореляція у триплоїдних жаб була виявлена лише для Корякова ($p=0.038$) та Замулівки ($p<0.001$) – в останньому випадку коефіцієнт сягнув 0.54 .

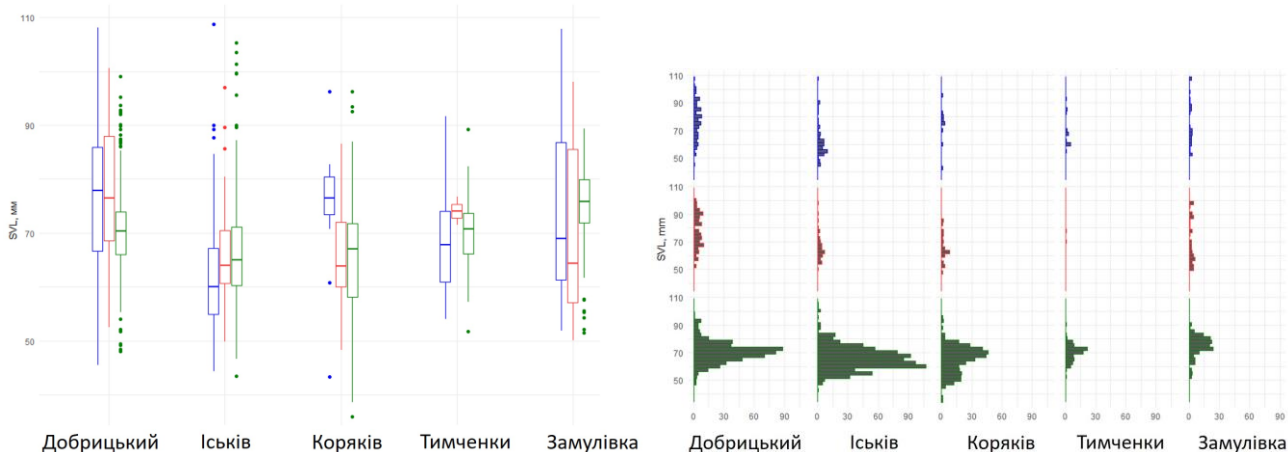


Рисунок 4.17. Розподіл довжини SVL у трьох форм зелених жаб з кожної ГПС

2n <i>P. esculentus</i> SVL				
ГПС	Іськів	Коряків	Тимченки	Замулівка
Добрицький	0,000	0,000	0,384	0,000
Іськів		0,481	0,000	0,000
Коряків			0,000	0,000
Тимченки				0,000
<i>P. ridibundus</i> SVL				
ГПС	Іськів	Коряків	Тимченки	Замулівка
Добрицький	0,000	0,352	0,153	0,327
Іськів		0,010	0,187	0,006
Коряків			0,507	0,533
Тимченки				0,722
3n <i>P. esculentus</i> SVL				
ГПС	Іськів	Коряків	Тимченки	Замулівка
Добрицький	0,000	0,000	0,859	0,001
Іськів		0,483	0,887	0,756
Коряків			1,000	0,632
Тимченки				0,684

Рисунок 4.18. Попарне порівняння (тест Дана) довжин SVL між жабами кожної з форм між різними ГПС; р значущих різниць виділено червоним

Розмір тіла значуще варіював у різних діапазонах у трьох форм в кожній з п'яти систем ($p < 0.05$) (Рис. 4.17). Диплоїдні *P. esculentus* із Замулівки значущо відрізнялися від таких з усіх інших систем. Триплоїди були найбільші у Добрицькому ставку. Озерні жаби Іськова ставка були помітно меншими за озерних жаб майже всіх інших систем (Рис. 4.18).

Мінливість вибірових параметрів розміру тіла може бути пояснена також мінливістю вікового складу жаб, що реєструвалися кожного року приблизно в той самий період. Цей склад, втім, має, судячи з усього, тенденцію до зміни всередині кожної ГПС характерним для неї чином. Існують також свідчення про зв'язок розміру тіла зелених жаб зі складом ГПС (Hermaniuk et al. 2020).

Отже, ні розподіл еритроцитів у жаб з різною плоідністю, ані розподіл розмірів тіла у різних видів або зв'язок розміру еритроцитів з розмірами тіла – не є універсальними показниками. Кожна ГПС, вочевидь, формує власні особливості онтогенезу дорослих жаб, що призводять до окремого характерного розподілу кожного з таких показників. Причому ці показники мають тенденцію до мінливості з часом навіть в середині систем. Деякі системи виявляються більш схожими одна на одну, як-от ГПС Іськова та Корякова ставків. Залежність такої схожості зі складом, а отже і з внутрішньо-популяційними процесами, ще належить прояснити.

4.6.2. Розміри еритроцитів у пуголовків та цьогорічок

Характер мінливості розмірів еритроцитів був також досліджений на вибірках цьогорічок і пуголовків з різних природніх ГПС та з потомства експериментальних кладок. Розміри тіла різних цьогорічок не порівнювалися, бо на дрібних амфібій, щойно завершивших пристосування до наземно-повітряного середовища, впливає занадто багато екологічних факторів, відокремити ефект яких від ефекту генетичної компоненти не представляється можливим (в т.ч. Nilman et al. 2009; Wells 2007; Vitt i Caldwell 2014)

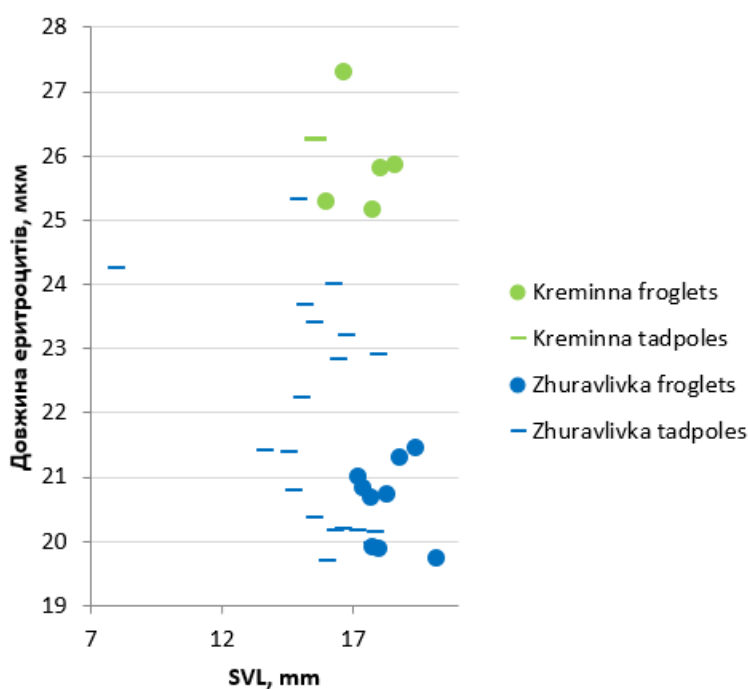


Рисунок 4.19. Розподіл представників потомства з ГПС Кременної та

Журавлівського гідропарку за довжиною еритроцитів та довжиною тіла

У 1 пуголовка і 5 цьогорічок з експериментального потомства гібридної LLR-самиці з ГПС Кременної та місцевого ♂*P. ridibundus* (пункт 5.3) та у 19 пуголовків і 9 цьогорічок з експериментального потомства пари ♂*P. esculentus* × ♀*P. ridibundus* з ГПС Журавлівського Гідропарку (пункт 5.4) була взята кров (в ході розтину для отримання тканин для цитологічного і молекулярного аналізу) методом, аналогічним приготуванню препаратів сухих мазків крові для дорослих жаб.

Для всіх цих особин була виміряна середня довжина еритроцитів, а також довжина тіла, а саме «snout-vent length». Графік розподілу досліджених особин за цими двома параметрами представлений на Рис. 4.19.

Кремінський пуголовок мав стадію розвитку 45 (метаморф). Усі 5 особин з потомства кремінської пари були визначені молекулярними методами як LLR-*P. esculentus*, а за анатомією гонад – як самиці. Серед журавлівських пуголовків було 7 метаморфів (стадії 44-45) та 12 особин на 32-39 стадіях. 20 з 28 потомків журавлівської пари були прогенотиповані мікросателітним методом, серед них виявилися представники *P. ridibundus* та гібриди з невідомими геномними композиціями. Гібридами буди лише самці, а озерними жабами лише самиці, що було екстрапольовано і на негенотипованих особин. Деталі див. у пункті 5.3 та 5.4.

Отримані дані свідчать про те, що навіть на ранніх етапах розвитку розмір еритроцитів у триплоїдних гібридів з ГПС Кремінної вірогідно потрапляє в достатньо типовий для триплоїдних жаб діапазон >25 мкм.

Діапазон розмірів еритроцитів у потомків з ГПС Журавлівки був широким – від дрібних еритроцитів <20 мкм (як у пуголовків, так і у цьогорічок) до крупних клітин в області гіпотетичної триплоїдії >25 мкм (1 пуголовок). Характерно, що великі еритроцити мав пуголовок-самець, вірогідно *P. esculentus* – але така довжина еритроцитів дає підстави сумніватися в його диплоїдності.

Відомо (Drohvalenko et al. 2021), що розмір еритроцитів цьогорічок може бути достатньо неточним в якості критерія оцінки їхньої плоїдності за рахунок більшого діапазону. Так, середнє середніх розмірів еритроцитів у диплоїдних ювенілів з ГПС Тимченків, чия плоїдність була підтверджена каріологічно, складало цілком «диплоїдні» 22.64 мкм, тоді як діапазон був від 19.50 до 28.48 мкм. Діапазон розмірів еритроцитів у підтверджено триплоїдних ювенілів склав 20.23-32.01 мкм з цілком «триплоїдним» середнім 26.38 мкм – тобто, навіть більшим, ніж у диплоїдів (Рис. 4.20,

ліворуч). Серед непроаналізованих каріологічно ювенілів зареєстрована особина з еритроцитами 17.81 мкм – але нема жодної впевненості в її плідності.

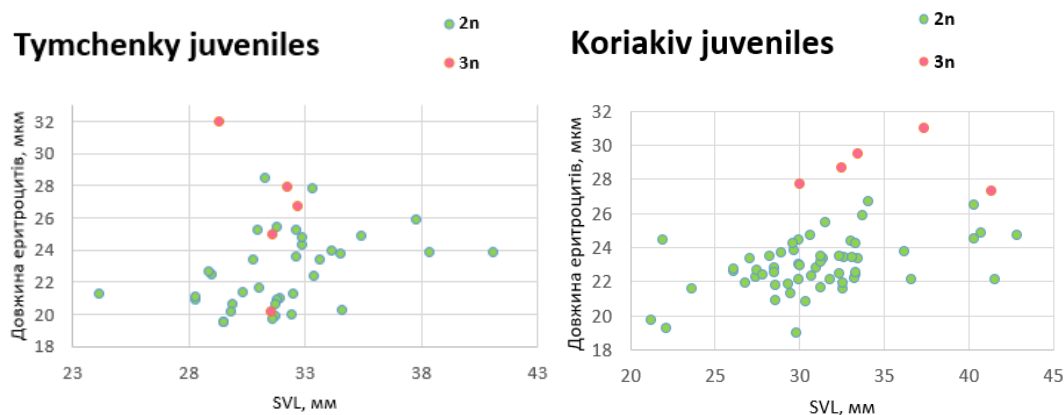


Рисунок 4.20. Розподіл ювенільних особин за розміром еритроцитів та розміром SVL у ГПС Тимченків (ліворуч; за Drohvalenko et al. 2021 зі змінами) та Корякова ставка (праворуч)

На противагу цьому, у підтверджено диплоїдних ювенілів ГПС Корякова ставка діапазон розміру еритроцитів склав 19.04-26.73 з цілком «диплоїдним» середнім 22.96 мкм, а діапазон еритроцитів у підтверджених триплоїдів – 27.77-31.03 мкм з «триплоїдним» середнім 29.25 мкм (Рис. 4.20, праворуч).

Ювеніли з ГПС Кремінної та Брусівки, піймані у природі, продемонстрували загалом ту саму картину: диплоїди вкладаються у «диплоїдний» діапазон: 18.12-25.48 мкм (з більшістю особин в меншій стороні спектру), а триплоїди в «триплоїдний»: 27.25-30.27 мкм (Рис. 4.21). Єдине виключення – диплоїдний ювеніл з Кремінної, що мав еритроцити 28.98 мкм, – не порушує загальної закономірності, а лише звертає увагу на необхідність перевірки плідності точними методами.

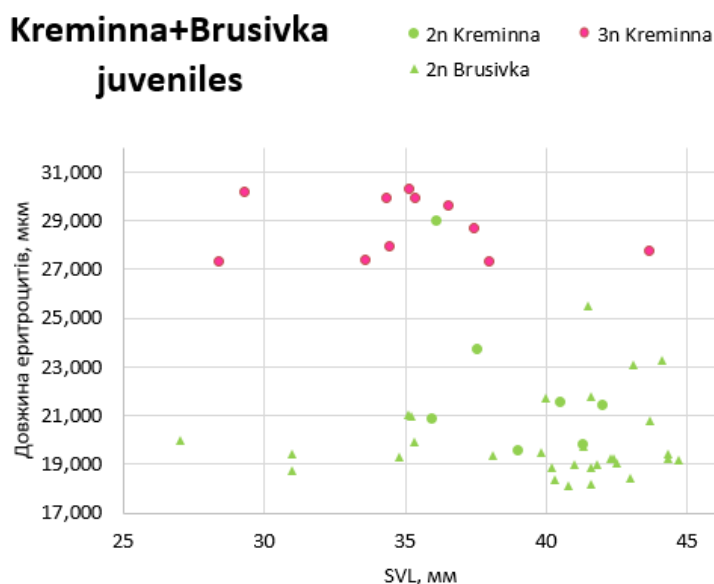


Рисунок 4.21. Розподіл ювенільних особин за розміром еритроцитів (вісь Y) та розміром SVL (вісь X) у ГПС Кременної та Брусівки

Вірогідно, розподіл довжин еритроцитів для ювенілів зелених жаб з Чорнобильської зони (пункт 3.4) являє собою аналогічне явище з більшістю диплоїдних особин, що потрапляють до «диплоїдного» діапазону розмірів еритроцитів та поки неясною кількістю триплоїдів з можливими поодинокими виключеннями крупноклітинних диплоїдів у «триплоїдному» діапазоні розмірів (Рис. 4.22).

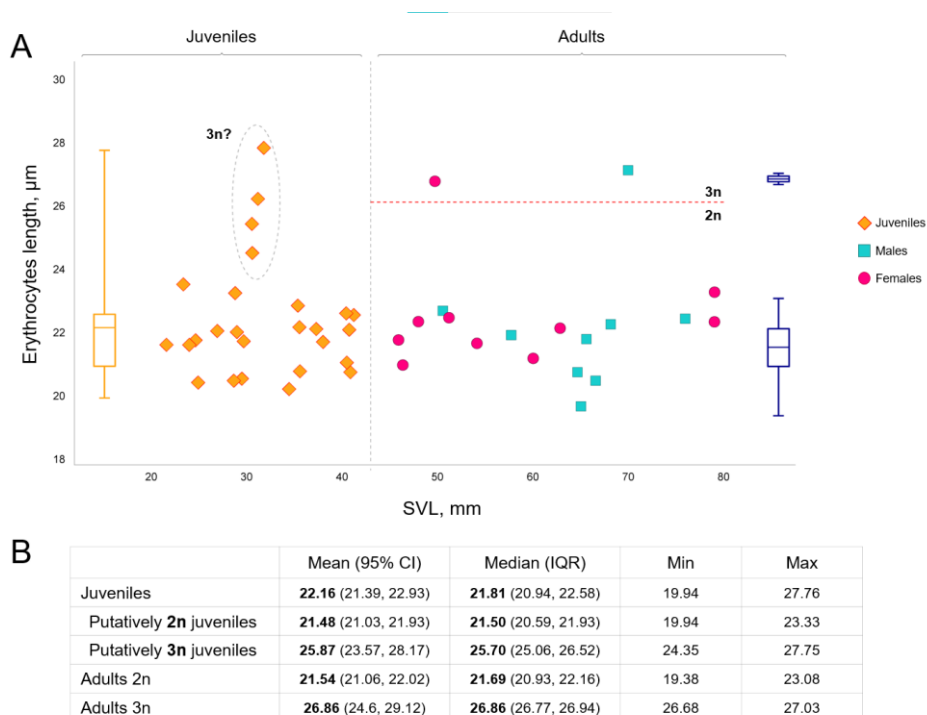


Рисунок 4.22. **A.** Розподіл жаб, пійманих в Чорнобильській Зоні відчуження за середніми довжинами еритроцитів та SVL; ювеніли позначені жовтим. Пунктирне коло позначає ювенілів з неясною плоїдністю; «боксплоти» позначають середнє, IQR та крайні значення. **B.** Параметри довжини тіла для різних груп жаб (за Drohvalenko і Fedorova 2022).

Варто відзначити, що для ювенільних особин з заплави р. Сіверський Донець (що містить складну R-E-Ep ГПС), проаналізованих і каріологічно, і за розмірами еритроцитів, встановлено зменшення межового розміру еритроцитів між ди- та триплоїдними особинами (Темников et al. 2012).

На розглянутому на початку підпункту матеріалі – потомках експериментальних схрещувань, – помітно, що щойно завершивші метаморфоз, цьогорічки також демонструють типову для визначеної для них плоїдності картину: триплоїдні кремінські цьогорічки мали діапазон розмірів 25.14-27.29 мкм, а диплоїдні журавлівські – 19.71-21.44 мкм. Це дає підстави вважати, що плоїдність навіть наймолодших представників представлених систем може бути значною мірою вірно визначена за промірами еритроцитів. Феномен варіабельності розмірів клітин у ювенілів з ГПС Тимченків лишається відкритим.

На розмір еритроцитів пуголовків може впливати багато факторів. Перш за все, варто пам'ятати, що личинки амфібій мають інший тип гемоглобіну у своїх еритроцитах, що повністю замінюється (вірогідно, разом з клітинами крові) на дорослий під час метаморфозу (Just et al. 1980). Вироблення гемоглобіну у пуголовків регулюється в тому числі тироксином (Moss і Ingram 1965), чий ефект включає в себе також регуляцію метаморфозу (наприклад, (Tata 2006). Суттєва частина проаналізованих пуголовків (на стадіях 32-39) мали затримку у розвитку (див. пункт 5.4). Розміри їхніх клітин були від середнього до великого (21.41-25.32 мкм), що гіпотетично може бути пов'язаним з гормональними порушеннями. Еритроцити метаморфів виявилися близькими за розмірами до клітин сформованих цьогорічок з цієї ж кладки – що може бути якраз ознакою поступової заміни личинкового пулу еритроцитів на дорослий.

Отже, ранній постметаморфічний онтогенез у частині ГПС, вочевидь, формує розподіл розмірів еритроцитів, що відповідає плоідності особин. Певні ГПС, очевидно, становлять виключення: онтогенез цьогорічок в них веде до розвитку таких розмірів еритроцитів, що не пов'язані з кількістю ДНК у ядрі.

Висновки Розділу 4

- Показано ефективність розробленої на основі існуючих практик і використаної для отримання експериментального потомства прижиттєвої методики штучного схрещування зелених жаб.
- Виявлені, в ході вивчення морфологічних відмінностей у розвитку пуголовків різних представників *P. esculentus* complex, якісні (забарвлення) та кількісні (зовнішні проміри) критерії, що за певних умов дозволяють розрізняти пуголовків батьківських видів, диплоїдних та триплоїдних гібридів.

- Описано ряд особливостей розмноження і розвитку різних представників *P. esculentus* complex, включно з аномаліями розвитку потомства та відсталістю/розтягнутістю розвитку личинок, а також фенологічні особливості, як-от пластичність строків нересту.
- Показано, що такі маркери онтогенезу зелених жаб, як розміри тіла та розміри еритроцитів є варіабельними і у різних видів, і серед жаб з різною плоїдністю, а також відрізнялися між різними ГПС. Це свідчить про пластичність онтогенезу навіть в межах однієї форми даного комплексу, а також про знижену діагностичну цінність кожного з таких параметрів поза контекстом конкретної ГПС.

РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ДОБОРУ В ГПС БАСЕЙНУ СІВЕРСЬКОГО ДІНЦЯ

5.1. Особливості добору в ГПС Іськова ставка

5.1.1. Аналіз природної популяційної системи

Існування геміклональних популяційних систем нерозривно пов'язане з балансом між гібридними формами, що продукують клональні гамети, та батьківськими видами (та частково окремими гібридними формами), які здатні продукувати рекомбінантні гамети. Геноми, що передаються клонально з покоління в покоління, неминуче втрачають своє різноманіття. А занадто велика частка гібридів конкурує з батьківськими видами під час розмноження, зменшуючи їхнє власне відтворення і, відтак, підриваючи своє власне підґрунтя для розмноження в майбутньому (Шабанов 2015).

Саме тому особливий інтерес викликала ГПС, що населяє Іські ставки, що належить території НПП «Гомільшанські ліси» За історію свого моніторингу, що ведеться з 2010 року (Е. V. Meleshko і Kravchenko 2012; О. V. Meleshko, Korshunov, і Shabanov 2014; Biliaiev et al. 2018; М Drohvalenko, Pustovalova, і Fedorova 2019), гібриди тут завжди реєструвалися у надзвичайно високій частці – до 100% у окремих вибірках. Цю систему помилково описували як повністю гібридну (Лада 1998), хоча *P. ridibundus* реєструвалися тут в більшість років (див. пункт 3.6). Серед всіх форм незмінно домінуючими за чисельністю були диплоїдні *P. esculentus*.

Дослідження гаметогенезу самців LR-*P. esculentus* показало їхню вірогідну амфіспермічність (Biriuk et al. 2016; Pustovalova et al. 2022), в той час як для самиць LR-*P. esculentus* був показаний гаметогенез вірогідно лише R-ооцитів (Dedukh et al 2015; Biriuk et al 2016).

Відповідно до стабільно високої частки диплоїдних гібридів у системі поставало питання про стійке відтворення в цій системі, що не дозволяє вироджуватися геномам обох видів.

Сукупна вибірка з 50 особин дорослих зелених жаб та 5 пуголовків була зібрана в липні 2019 та 2020 років з метою проаналізувати поточний склад популяційної систем та за допомогою популяційно-генетичного аналізу виявити закономірності спадкування геномів та добору серед їх носіїв (див. в т. ч. Drohvalenko, Pustovalova, i Fedorova 2019).

Первинно вид та стать жаб визначали за допомогою морфологічних ознак. Пізніше видова приналежність була підтверджена за допомогою мікросателітного аналізу (з використанням видоспецифічних локусів чи видоспецифічних алелів) та видоспецифічних алелів SNP в послідовності гену убіквінол-С-редуктази (*uqcrfs1*). Для личинок був застосований лише молекулярний аналіз, а їхню стать визначили за анатомічними особливостями гонад (пункти 2.4-2.6).

ДНК була виділена зі зразків крові (~50 мкл), що бралася з верхньощелепної вени, та зі зразків тканин пуголовків. Для мікросателітного аналізу були застосовані 16 мікросателітних локусів: GA1A19, R1CA18, R1CA1b5, R1CA2a34, Re1Caga10, Re2Caga3, R1CA1b20, R1CA5, Rrid082A, Res17, Res22, Rrid171A, CA1a27, Ga1a23, Rrid064A, Rrid135A (підпункт 2.6.2).

Отримані набори мікросателітних алелів служили підґрунтям для аналізу генетичного різноманіття та оцінки клональності геномів. Геноми батьківських видів були проаналізовані окремо, оскільки суттєво різняться генетично. В якості референтних геномів (для встановлення відповідності крос-специфічних алелів геномам різних видів) були також проаналізовано зразок *P. lessonae* з р. Псел (див. підпункт 3.3.3), зразки 16 особин *P. lessonae* зі Словаччини (Čičov, 47.778 N, 17.749 E; Sap, 47.821 N, 17.617 E; Veľký lél, 47.755 N, 17.947 E; Rusovce, 48.057 N, 17.154 E; Závod, 48.541 N, 16.988 E) та

39 *P. ridibundus* з Кременної, Брусівки (пункт 5.3) та Добрицького ставку (пункт 3.6).

В якості оцінок генетичного різноманіття були застосовані наступні: середня кількість алелів на локус (N_a) (Hughes et al. 2008) та невикривлена очікувана гетерозиготність (u_{He}). Клональність геномів була оцінена за допомогою аналізу різноманіття мультилокусних генотипів (MLG), різноманіття генотипів (Div) та мультилокусного нерівноважного зчеплення (LD). Для оцінки інформативності використання мікросателітів в якості маркерів, для R-геномів був також розрахований показник ймовірності ідентичності (PI), який сягнув тут 1.3×10^{-7} – що є достатньо низькою ймовірністю випадкового збігу даних мікросателітних алелів в даному наборі локусів (N. V. M. Pruvost et al. 2015).

	RR	LR	LRR
Females	2	2	4
Males	0	46	1

Рисунок 5.1. Склад проаналізованої вибірки зелених жаб з Іського ставку (включаючи пуголовків)

Виявлений склад вибірки подано у Рис. 5.1. Варто зазначити, що серед дорослих жаб був лише 1 *P. ridibundus* (інший – пуголовок), а триплоїди всі були зареєстровані лише серед дорослих.

Серед L-геномів (53 проаналізовано) було виявлено 9 MLG (~клональних ліній), з яких лише 4 були «унікальними» – належали лише одній особині з даної вибірки, – інші були розділені між 4-21 особиною. Середня кількість алелів на локус була 1.75 для L-геномів, генотипічне різноманіття (Div) сягало 0.732, гетерозиготність (u_{He}) – 0.119, а нерівноважне зчеплення (LD) – 0.076.

Оскільки 3 LRR-*P. esculentus* та 2 *P. ridibundus* мали гетерозиготність у R-геномах більше, ніж в одному локусі, були створені «штучні» R-геноми, які розподілили усі можливі варіанти комбінацій алелів в цих локусах. Отож, з 76 отриманих R-геномів 74 являли собою унікальні MLG, і лише 1 MLG ділили між собою два гібрида: дорослий та пуголовок. Середня кількість алелів на локус була 5.67 для R-геномів, генотипічне різноманіття (Div) сягало 1, гетерозиготність (uHe) – 0.542, а нерівноважне зчеплення (LD) – 0.020.

Знижене генотипічне різноманіття, різноманіття алелів та різноманіття MLG разом з підвищеним (відносно R-геномів) нерівноважним зчепленням L-геномів вказує на їхню високу клональність. І навпаки, високе різноманіття та низьке зчеплення R-геномів є індикатором рекомбінації таких геномів, що, вочевидь, відбувається в ГПС Іськова ставка регулярно.

За відсутності батьківського виду *P. lessonae* у всьому басейні Сіверського Донця (Leo J Borokin et al. 2004; D. Shabanov et al. 2020) низьке різноманіття і висока клональність L-геномів була очікуваною. Втім, ґрунтуючись на даних з північно-європейських популяцій здатність до рекомбінації L-геномів можна припустити для LLR-*P. esculentus* (Christiansen 2009). Такі триплоїди відсутні у проаналізованому тут зразку, але відомі для Іськова ставка (Dedukh et al. 2015; Шабанов 2015; Viriuk et al. 2016), хоча очевидно, що їхня частка має бути досить малою. Відтворення LLR-гібридів мало б залежати від диплоїдних гамет – і, як не дивно, диплоїдні LR-гамети відомі з Іськова ставка саме для єдиної LLR-самиці (Dedukh et al. 2015). Доповнюючі їх L-гамети відомі для гібридних амфіспермічних самців звідси, але у невисокій кількості (Pustovalova et al. 2022); LR-самки продукують, вірогідно, лише R-яйцеклітини (Dedukh et al. 2015). Тож низька чисельність LLR-гібридів тут є закономірною.

Високі показники різноманіття R-геномів однозначно свідчать про їх рекомбінацію в системі Іськова ставка. Очевидно, що ця роль має належати батьківським *P. ridibundus*, а також, гіпотетично, LRR-гібридам (Christiansen 2009) – хоча обидві ці форми і перебувають у меншості в даній системі.

Ситуація нагадує повну залежність диплоїдних гібридів від L-гамет, що продукують рідкісні *P. lessonae*, в одній з ГПС Словаччини (Peter Mikulíček et al. 2015).

Відомий гаметогенез присутніх в ГПС Іськова ставка форм разом з даними молекулярного різноманіття свідчать про ознаки добору, що відбувається серед потомства гібридів.

Диплоїдні гібриди клонально передають в своїх гаметах обидва батьківські геноми: (L)- та (R)-сперматозоїди встановлені для самців, (R)-яйцеклітини встановлені для самиць. Оскільки вони є чисельно домінуючою тут формою, схрещування між ними мають бути неминучими. Якби LR-потомство від таких схрещувань систематично виживало б, то це означало б систематичну експансію клональних ліній обидвох батьківських геномів в генетичний пул гібридів. І внаслідок цього ми б спостерігали підвищену клональність серед R-геномів – чого не було зареєстровано. Можливо, єдиний LR-пуголовок, що мав однаковий R-геном (з точки зору MLG) з дорослим LR-гібридом – був як раз слідом існування такого потомства. Отже, можна припустити існування механізму, який сприяє зникненню частини потомства-носіїв генотипу LR (Рис. 5.2); дещо схожі явища спостерігалися у інших ГПС (Abt Tietje i Reyer 2004).

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

Рисунок 5.2. Потенційна схема схрещувань у ГПС Іськова ставку на основі даних щодо гаметогенезу місцевих гібридів (Dedukh et al. 2015; Biriuk et al 2016; Pustovalova et al. 2022). «?» - типи гамет, відомі для даних форм з інших ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Зелений колір позначає форми, відомі серед дорослих; жовтий – відомі серед дорослих у невеликій кількості та серед цьогорічок у великій; червоні – не спостерігалися у ГПС.

Таким чином, диплоїдні гібриди, вірогідно, відтворюється у схрещуваннях з формою, яка передає рекомбінантні, високо різноманітні R-гамети – поза гіпотезами, це як мінімум озерні жаби. Однак, озерні жаби (RR) мали б також відтворюватися у схрещуваннях – бо суттєва частка гамет гібридів (у LR-самиць – всі) несе саме R-геноми. Але ми бачимо постійно невелику частку *P. ridibundus* (див. пункт 3.6) – що схиляє до гіпотези про їхню елімінацію також. Вивчення випадкової вибірки з 31 цьогорічки з Іськова ставка показало значну частку (68%) самиць *P. ridibundus* серед них (Макарян et al. 2016). Питання, чому більшість таких особин озерної жаби не доживають до дорослого віку (див. Рис. 5.1), лишається відкритим.

Розуміння ситуації ускладнюється невідомим співвідношенням LR-самців, які продукують L- та R-гамети в тому чи іншому співвідношенні (Pustovalova

et al. 2022) – причому існують навіть певні свідчення конкуренції між сперматозоїдами, що несуть той чи інший геном (Leszek Berger і Rybacki 1992; 1994).

Частково, роль фактору, що «грає проти» *P. ridibundus* можуть виконувати екологічні умови цього локалітету. Іськов ставок є мілкою ізольованою водоймою майже без проточної води, а в останні роки суттєво скоротив свої розміри та глибину і почав регулярно цвісти. Озерні жаби є найбільш вимогливим до високого рівню кисню у воді видом українських зелених жаб (Plötner 2005), а також відомі тим, що переважно зимують саме під водою (Leszek Berger і Berger 1992). Враховуючи, що гібридолізне потомство гібридів в експерименті доживало до своєї першої гібернації (LL- та RR-цьогорічки; Jakob і Arioli 2007) – то саме вона могла б стати критичним фактором в умовах даного ставка. Гібриди ж, навпаки, більше пристосовані до невеликих водойм – а ще схильні до більш далеких міграцій (Plötner 2005), що могло б підживлювати їхній пул за рахунок емігрантів. До того ж, пуголовки *P. esculentus* показали вищу виживаність у «складних» умовах (Raymond D. Semlitsch і Reyer 1992) і за нижчої температури (Nicolas B. M. Pruvost, Hollinger, і Reyer 2013), що мало б сприяти виживаності кожного нового покоління гібридів.

5.1.2. Аналізуюче схрещування

Для дослідження характеру передачі геномів та моделювання складу потомства у диплоїдних гібридів Іськова ставка, в 2021 році було проведене аналізуюче схрещування ♂*P. esculentus* з Іськова ставка, відловленого в серпні 2020 року, та ♀*P. ridibundus* з популяційної системи Удянського водосховища (див. підпункт 3.5.4), відловленої 10.06.2021 року.

Батьки отримали ін'єкції «Сурфагону» в розмірі 1.0 мл кожен (самиця за добу до схрещування, самець за 2 години). Схрещування відбувалося шляхом природнього амплексусу зсаджених разом тварин. Після відкладання ікри дорослі тварини були відсажені. Розвиток ікри відбувався за температури

навколишнього середовища надворі (середина червня 2021 року), у пластикових 100-л контейнерах (розташовані під накриттям), з рівнем води, достатнім для природньої аерації всієї товщі.

Вибірки зразків тканин пуголовків були взяті тричі: у віці «пізніх ембріонів» (6 діб розвитку, ~18 стадія за Gosner 1960), «ранніх личинок» (9 діб, ~21 стадія) та «повноцінних» пуголовків (20 діб, ~24 стадія). Перші дві вибірки включали в якості зразків цілих особин, тому вже проаналізовані представники не могли вплинути на склад наступних вибірок (бути проаналізованими двічі).

Генотип пуголовків був визначений за допомогою 16 мікросателітних локусів та видоспецифічних SNP в послідовності гена *uqcrfs1* (див. попередній пункт). Результати представлені у Рис. 5.3:

Age, days (Gosner stage)	Genotype		% LR
	LR	RR	
6 (18)	1	3	25%
9 (21)	0	20	0%
20 (24)	1	10	10%

Рисунок 5.3. Розподіл генотипів у проаналізованому потомстві експериментального аналізуючого схрещування LR-самця з Іськова

Серед потомства з аналізуючого схрещування були виявлені лише диплоїдні LR-гібриди та представники *P. ridibundus* (RR). Внаслідок дуже малого віку пуголовків їхня стать не могла бути визначена.

Такий результат вже додатково підтверджує гіпотезу про розповсюдженість амфіспермії серед Іськовських самців (Pustovalova et al. 2022): даний самець передавав і L-, і R-гамети.

Увагу привертає коливання частки гібридів – і, відповідно, батьківського виду, – серед потомства різного віку. Враховуючи масовість кладки і випадковість взяття проб, співвідношення форм у вибірках можна справедливо вважати наближеними до реальних.

Частка гібридів змінилася від чверті на найранніших етапах, через <5% (<1/20) до 10%. Співвідношення кількостей гамет L-типу до R-типу, продукованих батьком, слід вважати рівною співвідношенню форм у першій вибірці – 1 : 3. Падіння частки гібридів могло бути пов'язаним лише зі скороченням кількості носіїв диплоїдного гібридного генотипу – що відповідає гіпотезі про елімінацію носіїв генотипу LR (див. попередній пункт).

Наступне зростання частки гібридів пов'язане, судячи з усього, вже з добором проти носіїв RR-генотипу. Добір проти батьківської форми є достатньо відомим явищем для геміклональних систем, яке, вірогідно, служить для балансування всієї системи проти переважання батьківських форм (Reyer, Arioli-Jakob, і Arioli 2015). На результатах даного експерименту можна бачити дію (ймовірно, один з етапів дії) механізму такого відбору: загибель на ранніх етапах розвитку.

Зникнення *P. ridibundus* у потомстві гібридів описане і конкретно для Іськова ставка (див. попередній пункт). Щоправда, воно було спостережене більшою мірою на порівнянні складу дорослих жаб та цьогорічок (31 особина) – серед яких співвідношення гібридів та озерних жаб було ~1:2 (Makaryan et al. 2016). Це мало б бути пов'язаним зі смертністю після метаморфозу – але на цих даних також очевидним є пролонгована смертність *P. ridibundus* впродовж всього розвитку нового покоління в системі Іськова ставка.

Більш ранні дослідження вибірки з 20 диких пуголовків з Іськова ставка (Пустовалова, Батуева, і Харченко 2015) продемонстрували наявність лише 1 триплоїдного пуголовка, тобто 5% від загального складу; генотипи і стать пуголовків не визначалися, пуголовки мали 32-35 стадії розвитку. Для вибірки з 5 диких пуголовків на стадіях розвитку 38-42, генотипованих мікросателітним методом (див. підпункт 5.1.1), співвідношення LR:RR склало 1:4. Співвідношення *P. esculentus* до *P. ridibundus* серед диких цьогорічок, вочевидь, близьке до 1:2, всі досліджені особини диплоїдні (Makaryan et al. 2016). Таке саме співвідношення серед дорослих (за всі роки моніторингу в

сумі) склало 9:1 з загальною часткою триплоїдів, плаваючою від 0% до 18% (пункт 3.6). Отже, добір проти генотипу RR очевидний протягом всього онтогенезу зелених жаб в цій системі, добір проти диплоїдів та триплоїдів, вочевидь, не має чіткого патерну (частка дорослих триплоїдів сильно коливається), але теж відбувається, починаючи з личинкового віку.

5.2. Характер добору в ГПС Корякова ставка

Коряків ставок, що також входить до НПП «Гомільшанські ліси», географічно є сусідом Іськова ставка та багато в чому демонструє схожі риси. Гідрологічно він належить до басейну іншої річки – Коряків яр впадає одразу в долину Сіверського Донця. Коряків ставок не переживав в своїй історії таких масштабних пересихань як Іськів став, хоча їхній вік співставний – отже, можна припустити більш стійке існування ГПС, яка його населяє. Коряків яр, а отже і ставок, глибокий, має крутіші береги, тінистий за рахунок вкриваючого їх лісу – це зумовлює відмінності і в прогріві, в умовах зимівлі, і в умовах нересту та розвитку. Міграційне сполучення між Коряковим та Іськовим ставками навряд є інтенсивним, особливо в останні сухі роки, бо між цими балочними системами постає безлісий водорозділ. Такі географічні та екологічні особливості не могли не вплинути на особливості населення зелених жаб в цих водоймах (Korshunov 2008).

І все ж геміклональні популяційні системи цих двох ставків схожі за своїм складом. Обидві складаються значною мірою з диплоїдних гібридів, обидва містять деяку невисоку частку триплоїдів та *P. ridibundus*. З іншого боку, частка триплоїдів в Коряковому ставку була постійно наявною, на відміну від Іськова, де в певні роки поліплоїди не реєструвалися. *P. ridibundus* «щезали» в певні роки в обох системах. Хоча сумарно, за всі роки моніторингу, вивчений склад форм зелених жаб між двома системами значуще відрізняється – вклад в цей ефект переважно вносить склад систем в окремі роки, а частки всіх трьох

форм ($2n$ *P. esculentus*, $3n$ *P. esculentus* та *P. ridibundus*) коливаються в двох системах у співставних діапазонах (див. пункт 3.6).

Задля визначення особливостей добору, який відбувається серед різних форм *Pelophylax esculentus* complex в Коряковому ставку, окрім багаторічного дослідження складу був також проаналізований склад вибірки ювенілів (в широкому сенсі, можливо цьогорічок; 70 особин) та вибірки пуголовків (43 особини), зібраних у 2019 році.

Для всіх особин визначалася стать за морфологією гонад (Ogielska 2009) та плідність методом каріології метафазних пластинок. Для пуголовків метафазні пластинки були проаналізовані методикою FISH для визначення геномного складу особин. Стадія розвитку пуголовків визначалася за Gosper (1960).

Сумарні результати аналізу представлені в Рис. 5.4 та 5.5.

Ploidy	Genotype	Sex		
		F	M	?
Diploids	LR	6	6	7
	RR	4	2	3
	LL	0	1	0
	?	0	4	1
Triploids	LLR	1	3	0
	LRR	1	0	0
	L?R	1	1	1
	?	1	0	0

Рисунок 5.4. Склад проаналізованої вибірки пуголовків з Корякова ставка; «?» позначає невизначену стать.

Серед пуголовків генотип був визначений для 34 особин, ще для 3 триплоїдів генотип був визначений з точністю лише до гібридного, для 5 диплоїдів та 1 триплоїда генотип визначений не був. Невідомий генотип триплоїдних пуголовків не обов'язково має бути гібридним, адже ми не знаємо точно, коли можуть відсіюватися автотриплоїдні особини (LLL, RRR), якщо припустити їхню появу (Nicolas B. M. Pruvost, Hollinger, i Reyer 2013). Для

деяких статей не була визначена через ослабкий розвиток гонад. Пуголовки перебували на стадіях розвитку з 25 по 41.

Сумарне співвідношення статей було близьким до рівного: 14 самиць і 17 самців. Співвідношення статей серед триплоїдів становило 1:1, серед диплоїдів було близьким до рівного (10:13).

Серед пуголовків було зареєстровано обидві форми триплоїдів (LLR, LRR), сумарно серед обох статей, але конкретно LRR-самців виявити не вдалося. Підтверджених LLR-особин було вчетверо більше за підтверджених LRR-особин.

Серед диплоїдів співвідношення особин озерних жаб та гібридів становило ~1:2 (9:19). Ця частка значуще вища за таку частку серед дорослих ($p < 0.001$; див. пункт 3.6).

Серед порівняно старших пуголовків (стадія 40, крупні задні кінцівки) був зареєстрований самець *P. lessonae* – форма, яка не зустрічається серед дорослих зелених жаб на території всього басейну Сіверського Донця.

Триплоїди склали ~21% всіх проаналізованих пуголовків з Корякова ставка (9/43), така сама частка приходилася на *P. ridibundus*, пуголовки *P. lessonae* становили лише 2.3% (1/43).

Ploidy	Sex		
	F	M	?
Diploids	41	21	1
Triploids	6	1	0

Рисунок 5.5. Склад проаналізованої вибірки ювенілів з Корякова ставка; «?» позначає невизначену стать.

Серед ювенільних особин стать не була визначена лише для 1 особини. У вибірці переважали самиці у співвідношенні ~2:1 (47 самиць і 22 самця). Триплоїди склали 10% від загальної кількості (7/70). Визначення видової приналежності за зовнішньою морфологією не проводилося, оскільки для таких молодих особин (середній розмір – 31.4 мм) воно було б вкрай ненадійне.

Частка триплоїдів серед коряківських ювенілів незначуще відрізнялася від частки триплоїдів серед сумарної вибірки дорослих жаб за всі роки моніторингу ($p = 0.393$; див. пункт 3.6). В той же час, частка триплоїдів серед пуголовків відрізнялася від частки серед дорослих значуще ($p = 0.004$) – а від частки серед ювенілів незначуще ($p = 0.179$).

Варто зазначити, що виявлений склад генотипів не включає в себе деякі форми, що вже раніше виявлялися для Корякова ставка впродовж всієї історії його вивчення, за допомогою проточної ДНК-цитометрії. Так, LLR- та LRR-триплоїди були зареєстровані серед дорослих жаб також – самиця і самець, відповідно, – та серед ювенілів, але в достатньо невеликій кількості (Шабанов 2015).

Загалом, картина відтворення у Коряковому ставку виглядає наступним чином.

На етапі пуголовків зареєстровані всі генетичні форми *P. esculentus* complex: *P. ridibundus* RR, *P. lessonae* LL, *P. esculentus* LR, LRR та LLR. Кожна форма присутня в обох статях: самиці LRR, судячи з усього, також присутні, адже реєструвалися серед дорослих в минулому; самиці LL не знайдені, але їх присутність цілком вірогідна. Частки триплоїдів та озерних жаб високі.

На етапі ювенілів частка триплоїдів падає до ~10% і лишається приблизно такою ж, хоча і коливається, у дорослому віці. Серед триплоїдних ювенілів реєструються обидві генетичні форми (LRR, LLR), з невідомим співвідношенням статей. Єдині дані про дорослих свідчать про присутність LLR-самиць та LRR-самців. Ставкові жаби LL не реєструються вже серед ювенілів (Шабанов 2015).

Добір очевидно елімінує обидві батьківські форми, *P. ridibundus* та *P. lessonae*. Таке явище є класичним для геміклональних популяційних систем (Reyer, Arioli-Jakob, і Arioli 2015). Цікавим і певною мірою унікальним є можливість зареєструвати ланку цього процесу: вочевидь, в даній ГПС він розтягнутий до порівняно пізніх етапів розвитку пуголовків.

Також очевидним є добір проти триплоїдів, що помітно знижує їх частку з ходом онтогенезу – а саме між віковою стадією пуголовків та ювенілів. Набагато складніше питання: як саме ці форми утворюються?

Гаметогенез гібридів у Коряковому ставку досліджений слабо: хіба що для самців LR-*P. esculentus* тут надійно відоме продукування R-гамет (Biriuk et al. 2016). Однак, продукція L-гамет є життєво-необхідною умовою для самого існування R-E ГПС, без якої гібриди як форма не могли б відтворюватися – отже, якісь гібриди продукують і L-гамети. Система Корякова ставка, дарма що схожа на ГПС Іськова ставка, але ймовірніше генетично пов'язана з метапопуляцією зелених жаб, що населяє заплаву Сіверського Дінця, відому своїм надзвичайним різноманіттям (Шабанов 2015; Korshunov 2008) – хоча б за рахунок міграційних процесів, що могли б відбуватися по діючому руслу струмка в Коряковому яру.

Наприклад, LR-гібриди обох статей з заплавної ГПС відомі здатністю продукувати різні типи гамет: або різні особини з L- чи R-геномами, або суміші різних гаплоїдних гамет у тих самих особин (амфігаметичність) (Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2015; Dedukh et al. 2017). Для LR-самиць з заплави зареєстрована також здатність продукувати диплоїдні LR-гамети (Dedukh et al. 2017); для місцевих LR-самців така здатність достеменно не відома звідси. Заплавні триплоїди здатні продукувати і R-гамети (причому як LRR-, так і LLR-особини), так і L-гамети – при цьому здатність продукувати L-гамети загалом відома для LLR-гібридів з Сіверсько-Донецького центра різноманіття (Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2015).

Схема схрещувань в Коряковому ставку, запропонована на основі всіх припущень, наведена на Рис. 5.6.

♂ \ ♀		RR	LR		LRR		LLR		
		R	L	R	LR	R	L	L	R
RR	R	RR	LR	RR	LRR	RR	LR	LR	RR
L ^Y R	L ^Y	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y R	L ^Y LR	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y L	L ^Y R
	R	RR	LR	RR	LRR	RR	LR	LR	RR
LR ^Y	L	LR	LL	LR	LLR	LR	LL	LL	LR
	R ^Y	R ^Y R	LR ^Y	R ^Y R	LRR ^Y	R ^Y R	LR ^Y	LR ^Y	R ^Y R
L ^Y RR	L ^Y	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y R	L ^Y LR	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y L	L ^Y R
	R	RR	LR	RR	LRR	RR	LR	LR	RR
LRR ^Y	L	LR	LL	LR	LLR	LR	LL	LL	LR
	R ^Y	R ^Y R	LR ^Y	R ^Y R	LRR ^Y	R ^Y R	LR ^Y	LR ^Y	R ^Y R
	R	RR	LR	RR	LRR	RR	LR	LR	RR
L ^Y LR	L ^Y	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y R	L ^Y LR	L ^Y R	L ^Y L	L ^Y L	L ^Y R
	L	LR	LL	LR	LLR	LR	LL	LL	LR
LLR ^Y	L	LR	LL	LR	LLR	LR	LL	LL	LR

Рисунок 5.6. Пропонована схема схрещувань у ГПС Корякова ставка. Кольори встановлюють відповідність наявних форм формам у потомстві (окрім *P. lessonae* LL); без кольору – гамети. Надрядкова «Y» – стать генома.

Варіантів схрещувань, за якого утворюється потомство LL (обох статей) – порівняно багато. Було зареєстровано так мало пуголовків LL, вірогідно, за рахунок або загалом невисокої кількості L-гамет, або переважно ранньої смерті носіїв LL-генотипу. Варто додати, що зазвичай в умовах стабільних водойм пуголовки ставкових жаб є більш конкурентними за пуголовків гібридів (R. D. Semlitsch 1991) – але не в цьому випадку, хоча Коряків є відносно стабільною і водоймою, і системою (див. пункт 3.6).

Виходячи з припущень цієї схеми, триплоїдні форми мають утворюватися лише з одного гіпотетичного типу гамет у самиць – і при цьому їхня частка серед пуголовків суттєва. Це можна пояснити припущенням про більш широкую розповсюдженість диплоїдних гамет в даній системі – наприклад, продукованих диплоїдними гібридними самцями, як це відомо для ГПС Тимченків (Pustovalova et al. 2022). Окрім того, варто припустити, що частина диплоїдних форм також елімінується на ранніх етапах розвитку – до діапазону розвитку, в якому перебували досліджені пуголовки. Частка *P. ridibundus* також висока серед пуголовків і лише до дорослого віку знижується до

невеликої – отже, для досягнення такого співвідношення, LR-гібридів або має утворюватися менше, або елімінуватися на ранніх етапах розвитку більше. Враховуючи кількість гібридних форм, здатних до продукції гаплоїдних гамет – вірогідна дія механізму елімінації.

5.3. Відтворення в ГПС Кремінної і Брусівки

Для довгострокового стійкого існування будь-яка ГПС має бути внутрішньо збалансована між максимальною репродуктивною вигодою гібридів (кількістю потомства) і підтримкою стабільності системи без тиску на батьківські види (або будь-яку іншу форму, від чиїх гамет конкретні гібриди залежать) (Reyer, Niederer, і Hettyey 2003). Підтримка цього балансу включає різноманітні механізми. Це може бути селективна смертність носіїв певних генотипів – часто, але не завжди, батьківських (наприклад, Reyer, Arioli-Jakob, і Arioli 2015). Стерильність або порушення гаметогенезу чи розвитку гонад у гібридів також впливають на загальний вклад, який роблять ці форми у відтворення всієї системи (Reyer, Niederer, і Hettyey 2003; Bobrova et al. 2014; O. V. Biriuk et al. 2016; Szydlowski et al. 2017). Цей баланс додатково ускладнюється різними онтогенетичними стратегіями (різними темпами росту і набуття зрілості, кількістю продукованих гамет), що можуть практикувати різні особини навіть тієї самої генетичної форми (O. E. Usova, Kravchenko, і Shabanov 2015). Наявність і дія таких механізмів вочевидь пов'язана з різноманіттям потомства, яке дають гібриди – а отже і з різноманіттям продукованих ними гамет (Ditte G Christiansen 2009; D G Christiansen і Reyner 2011; Doležalková et al. 2016; O. V. Biriuk et al. 2016; Dmitry Dedukh et al. 2015; 2017; Eleonora Pustovalova et al. 2022; Chmielewska et al. 2022)

Триплоїдія гібридів не є новинкою Сіверсько-Донецького центру різноманіття: для зелених жаб вона відома давно і понині (Günther 1978; L. Berger 1983; Ditte G Christiansen et al. 2010) – а сам центр був виділений

зокрема і на підставі широкого її розповсюдження (Borkin et al. 2004, Biriuk et al. 2016; Shabanov et al. 2020; Dufresnes і Mazera 2020). Однак, навіть за давнього вивчення ГПС з триплоїдами у своєму складі, існують популяційні системи, відтворення – передача гамет гібридами, добір та смертність, і, врешті, підтримання сталого складу, – в яких викликає багато питань. Геміклональні системи такого типу, судячи з усього, розповсюджені (з невідомою щільністю) в нижній течії української частини Сіверського Донця (Шабанов 2015; Biriuk et al. 2016; Шабанов et al. 2017), а найбільше досліджені біля м. Кремінна (Луганська область; 49.012, 38.236) та с. Брусівка (Донецька область; 48.899, 37.790). За попередніми даними (Н. А. Дрогваленко і Макарян 2017; М. О. Drohvalenko et al. 2017) вони складаються з батьківського виду *P. ridibundus* та лише однієї форми *P. esculentus* – самиць з генотипом LLR. Дане дослідження було призване вивчити, як саме такий склад ГПС може відтворюватися, та який характер добору цьому сприяє.

Біотопи в згаданих локалітетах представляють собою заплавні озера (Брусівка) та притерасну старицю з озерами поряд та болотами на терасі (Кремінна) лівого берега Сіверського Донця. Територія біля м. Кремінна являє собою північну околицю НПП «Кремінські ліси».

Вибірки тварин збиралися протягом нерестового періоду 2016-2021 років – до вибірок потрапили лише дорослі та ювенільні жаби, без диких пуголовків. Ці вибірки призначалися для молекулярних досліджень ГПС, а тому свідомо формувалися зміщеними і не можуть слугувати підставою для кількісних розрахунків щодо складу ГПС.

Стать та вид (попередньо) всіх пійманих жаб визначалися на підставі зовнішньої морфології. Варто відзначити, що попередні дослідження виявили фенетичну одноманітність всіх гібридів з Кремінної та Брусівки – всі вони мали характерний фенотип, що гарно вирізняв їх серед будь-яких озерних жаб (Рис. 5.7).



Рисунок 5.7. Одноманітний фенотип ♀LLR-*P. esculentus* з Кременної, відловлених у 2021 році (фото: Федорова А.О., Дрогваленко М.О.)

Для всіх жаб був виміряний розмір (SVL) – в якості «ювенілів» нами розглядалися особини менше 45 мм (“froglets”; Dubois_2021). Для всіх відловлених жаб були взяті зразки крові на виготовлення сухих мазків – для попереднього визначення плідності за середньою довжиною еритроцитів (Bondareva et al. 2012).

Також три пари жаб (одна з Кременної та дві з Брусівки) були використані для схрещувань, які проводилися різними прижиттєвими методами. Кожна пара складалася з гібридної LLR-самиці та самця озерної жаби (RR).

Всі пари були зібрані під час нерестового сезону. Схрещування для пар з Брусівки (пара А і пара В) були організовані шляхом розміщення разом самців і самиць в пластикових контейнерах, частково заповнених водою, впродовж ночі – таким чином стимулювалася природня репродуктивна поведінка через амплексус і відкладання ікри. Після відкладання дорослі особини були відсажені.

Потомство від пари з Кременної було отримано повністю за допомогою оригінальної методики штучного запліднення (пункт 4.2). Обидва батьки отримали ін'єкцію «Сурфагону» (~2.5 мл): самиця за добу, а самець за дві години до запланованої процедури (за Vobrova et al. 2014 з модифікаціями). Ікра була акуратно вичавлена з клоаки самиці, а суспензію сперми отримали за рахунок промивання клоаки самця відстояною водою. Суміш ікри та суспензії сперми була полишена в чашці Петрі на добу для запліднення, після чого ікра була переміщена в постійні пластикові контейнери.

Усе потомство утримувалося в пластикових контейнерах з відстояною водопровідною водою. Пуголки з брусівських кладок утримувалися в умовах вуличного навколишнього середовища з природньою аерацією поверхні води. Пуголки з кременських кладок утримувалися лабораторно, з штучною аерацією (акваріумна помпа), але природнім сонячним режимом освітлення. Всі пуголки годувалися кормом TetraMIN (Drohvalenko 2021). Для проходження метаморфозу, були обладнані контейнери з острівцями суходолу.

Для особин з експериментальних кладок, що щойно пройшли метаморфоз, тут застосовувалася назва «цьогорічки» (окремо від «ювенілів» природніх вибірок). Для всього потомства була виміряна довжина SVL, а стать особин в потомстві визначалася за морфологією гонад (Ogielska 2009).

Для отримання метафазних пластинок, що пізніше використовувались для методу каріології чи/та FISH, у дорослих жаб та цьогорічок брався кишечник і кістковий мозок, а у пуголоків – зябра та кишечник. Визначення генотипу методом FISH було проведено для 63 особин з потомства пари з Кременної.

Для аналізу ДНК використовувалися або зразки крові, або зразки тканин (фрагменти пальців чи хвоста у пуголоків). Визначення генотипу проводилося за допомогою мікросателітного аналізу та аналізу послідовності SNP гену *uqcrfs1* (Tecker et al. 2017).

15 мікросателітних локусів було використано для генотипування: RICA5, Rrid082A, Res22, RICA18, Re2Caga3, Re1Caga10, RICA1b6, RICA2a34, Rrid064A, Ga1a23, CA1a27, Rrid135A, Rrid013A, Pper3.22, Pper4.7. Отримані набори мікросателітних алелів служили підґрунтям для аналізу генетичного різноманіття та оцінки клональності геномів. Геноми батьківських видів були проаналізовані окремо, оскільки суттєво різняться генетично. Для визначення видоспецифічних алелів у крос-специфічних локусах були використані також зразки *P. lessonae* з р. Псел (див. підпункт 3.3.3) та 16 зі Словаччини (Číčov, 47.778 N, 17.749 E; Sap, 47.821 N, 17.617 E; Veľký lél, 47.755 N, 17.947 E; Rusovce, 48.057 N, 17.154 E; Závod, 48.541 N, 16.988 E). Локуси RICA5, RICA18, RICA2a34, CA1a27 та Ga1a23 були L-специфічними; локуси Rrid082A, Rrid064A, Rrid135a, Res22, Re2Caga3 та Pper3.22 були R-специфічними; локуси Rrid013A, Re1Caga10, RICA1b6 та Pper4.7 ампліфікувалися в геномах обох батьківських видів.

Мірою клональності та різноманіття слугували перш за все мультилокусні генотипи (MLG), а також середня кількість алелів на локус (Na) (Hughes et al., 2008), невикривлена очікувана гетерозиготність (uHe), генотипічне різноманіття (Div) та мультилокусне нерівноважне зчеплення (LD). В якості показника інформативності набору обраних локусів та наявних алелів для аналізу різноманіття, був розрахований (лише для *P. ridibundus*, як для єдиного сексуального виду в регіоні) показник ймовірності ідентичності (PI) – він сягнув достатньо низького значення 1.3×10^{-7} і в Кремінній, і в Брусівці (N. V. M. Pruvost et al. 2015).

Сумарно за період 2016-2021 рр. було піймано 197 особин зелених жаб, з яких 117 в Кремінній (91 доросла тварина і 26 ювенілів) та 80 в Брусівці (49 дорослих тварин і 31 ювеніл). Для всіх тварин була визначена морфологічна видова приналежність. Для 178 особин була визначена середня довжина еритроцитів для первинного визначення плоідності. Сумарно 72 особини з природніх вибірок було прогенотиповано: 47 з Кремінної та 25 з Брусівки.

Було проаналізовано 94 особини потомства з експериментальних схрещувань: 74 від пари з Кременної (49 пуголовків і 25 цьогорічок), 20 особин від двох пар з Брусівки (лише пуголовки, по 10 з кожної кладки). З них прогенотиповано за допомогою мікросателітного аналізу, аналізу SNP, аналізу метафазних пластинок та FISH 89 особин: 71 від пари з Кременної та 18 від двох пар з Брусівки.

Склад генотипованої частини вибірок з двох популяційних систем наведено в Рис. 5.8:

	Genotype	Sex	Kreminna	Brusivka
Adults	LLR	F	23	8
		M	-	-
	RR	F	8	7
		M	12	2
		?	-	2
Juveniles	LLR	F	2	-
		M	-	-
	RR	F	1	-
		M	-	1
		?	1	5
Total frogs genotyped			47	25

Рисунок 5.8. Генотиповані зелені жаби з ГПС Кременної та Брусівки. «←» позначає відсутність певної форми у вибірці; «?» позначає відсутність впевнено ідентифікованих статевих ознак у особин.

Мікросателітний аналіз разом з аналізом SNP гену *uqcrfs1* однозначно підтвердив, що особини, ідентифіковані морфологічно як *P. esculentus*, є гібридами з генотипом LLR, а особини, ідентифіковані морфологічно як *P. ridibundus*, є озерними жабами з генотипом RR.

Серед гібридів були знайдені виключно самиці. Ознак присутності самців *P. esculentus* не було виявлено також і в польових умовах – експедиції, що відбувалися в нерестовий період, не зареєстрували шлюбних пісень гібридів. Серед озерних жаб частка обох статей виявилася близькою до 1 : 1 (точний тест Фішера: $p=0.152$ для Кременної та $p=0.659$ для Брусівки).

Дорослі диплоїдні жаби значуще відрізнялися у двох системах за довжиною еритроцитів: і окремо дорослі (Student's $p < 0.001$), і окремо нестатевозрілі (Mann-Whitney $p = 0.002$) і всі разом (M-W $p < 0.001$). Триплоїди з двох ГПС відрізнялися так само (Student's $p = 0.005$). Але чітка межа довжин еритроцитів між жабами різної плоідності була присутня всюди. Для більшості тварин генотип відповідав плоідності, визначеній за середньою довжиною еритроцитів (див. пункт 2.5). Виключення становили дві особини: ювенільна самиця *P. ridibundus* з незвично великими еритроцитами (28.98 мкм) та доросла триплоїдна самиця *P. esculentus* з Брусівки з порівняно малою довжиною еритроцитів (24.69 мкм) (Рис. 5.9).

Довжина еритроцитів дорослих триплоїдів значуще корелювала з їхньою довжиною SVL і в Кременній ($r = 0.628$, $p < 0.001$), і в Брусівці ($r = 0.637$, $p = 0.035$). Для диплоїдних жаб подібна кореляція була показана лише в ГПС Кременної ($r = 0.368$, $p = 0.01$). Для ювенілів такі кореляції виявлені не були (Рис. 5.9).

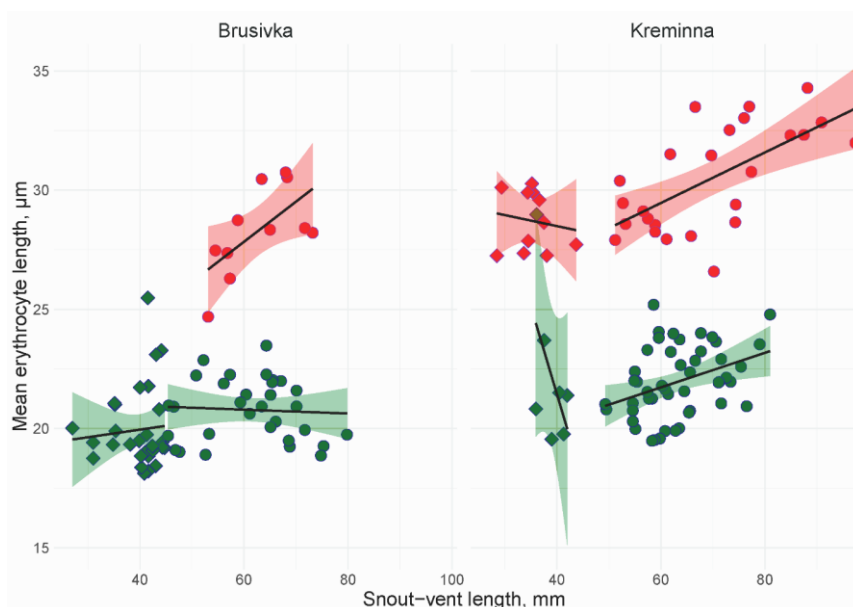


Рисунок 5.9. Розподіл жаб з ГПС Брусівки (ліворуч) та Кременної (праворуч) за їхніми довжинами еритроцитів та розмірами тіла; червоні – триплоїди, зелені – диплоїди, кола – дорослі, ромби – ювеніли.

Показники генетичного різноманіття (N_a , u_{He}) були суттєво вищими в R-геномах озерних жаб та LLR-триплоїдів, ніж в L-геномах LLR-триплоїдів.

Різноманіття R-геномів у гібридів було також дещо меншим, ніж таке у R-геномах озерних жаб. Деякі показники клональності не були обчислені для геномів брусівських гібридів через замалу чисельність їхньої вибірки. Деталі наведено на Рис. 5.10.

Genome	N	Na ± SE	uHe	LD	Div
RR Kreminna	22	6.889±1.495	0.576±0.094	0.040	1.000
RR Brusivka	17	6.778±1.706	0.568±0.098	0.042	1.000
RR Total	39	6.833±1.100	0.572±0.066		
R(LLR) Kreminna	25	4.222±1.176	0.502±0.104	0.033	0.987
R(LLR) Brusivka	8	2.667±0.601	0.456±0.108	-	-
R(LLR) Total	33	3.444±0.668	0.479±0.073		
L(LLR) Kreminna	25	1.333±0.236	0.090±0.056	0.105	0.692
L(LLR) Brusivka	8	1.444±0.338	0.093±0.068	-	-
L(LLR) Total	33	1.389±0.200	0.091±0.044		

Рисунок 5.10. Популяційно-генетичні показники зелених жаб з ГПС

Кремінної та Брусівки. N – розмір вибірки, Na – кількість алелів на локус, uHe – невикривлена очікувана гетерозиготність, LD – нерівноважне зчеплення, Div – генотипічне різноманіття, «-» – показник не був обчислений через низький розмір вибірки.

L-геноми виявилися гомозиготними за всіма локусами, окрім локуса Prpg4.7, який мав по 2 алеля у трьох особин гібридів.

В обох популяційних системах *P. ridibundus* (39 особин в сумі) мали лише унікальні MLG в їхніх R-геномах. Серед гібридів, 4 пари особин мали спільні MLG R-геномів; 25 гібридів також мали унікальні R-геномні MLG.

Унікальних L-геномів виявилось лише 6; інші L-геноми згрупувалися в 4 MLG (по 2-14 особин-носіїв кожного) (Рис. 5.11)

MLG	Population system		L-specific loci					Cross-specific loci			
	Kreminna	Brusivka	CA1a27	Ga1a23	RICA5	RICA18	RICA2a34	Rrid013A	Re1Caga10	RICA1b6	Pper4.7
A	6	3	111	120	255	186	143	300	95	86	412
B	2	0	111	120	255	186	143	300	95	86	416
C	14	0	111	120	255	186	145	300	95	86	412
D	2	0	111	120	255	186	145	300	95	86	416
E	0	1	111	120	255	186	143	300	95	86	400
F	0	1	111	120	255	186	143	300	95	86	404
G	1	0	111	120	255	186	143	300	95	86	408
H	1	0	111	120	255	186	143	300	95	86	420
I	1	0	111	120	255	186	145	300	95	86	412
J	0	1	111	120	255	189	143	300	95	86	412

Рисунок 5.11. Алельний склад MLG, виявлених серед L-геномів у LLR-*P. esculentus* з Кременної та Брусівки (колонка Population system). Алелі поліморфічних локусів виділені жирним.

Вибірки потомства від брусівських пар були зібрані лише один раз і включали в себе пуголовків на стадіях розвитку від «ранніх задніх кінцівок» до «гарно розвинутих пальців»: стадії 28-37 (потомство А - 28-33; потомство В - 30-37). Потомство від кременської пари було фіксоване послідовно, і в решті вибірка включала в себе як цілий спектр розвитку пуголовків на стадіях 25-39 (від щойно закрившогося оперкулюма до розвинутого п'яткового горба) та метаморфозуючих особин (стадії 40+) та цьогорічків (стадія 46). Окрім цього, фіксувалися особини, що померли своєю смертю та/чи мали вади розвитку.

Вибірки потомства від брусівських пар були зібрані лише один раз і включали в себе пуголовків на стадіях розвитку від «ранніх задніх кінцівок» до «гарно розвинутих пальців»: стадії 28-37 (потомство А - 28-33; потомство В - 30-37). Потомство від кременської пари було фіксоване послідовно, і в решті вибірка включала в себе як цілий спектр розвитку пуголовків на стадіях 25-39 (від щойно закрившогося оперкулюма до розвинутого п'яткового горба) та метаморфозуючих особин (стадії 40+) та цьогорічків (стадія 46). Окрім цього, фіксувалися особини, що померли своєю смертю та/чи мали вади розвитку.

Більшість (18) проаналізованих цьогорічок завершили метаморфоз за 70-77 днів, а інші 7 – за 91-104 днів. Однак, частина особин так і не вступила в метаморфоз, лишаючись на пуголовками чи метаморфами (30-45 стадії) аж до 94 дня життя.

Склад прогенотипованого потомства представлений у Рис. 5.12.

	Genotype	Sex	Brusivka		Kreminna	
			tadpoles (A)	tadpoles (B)	tadpoles	froglets
Progeny	LLR	F	1	3	20	22
		M	4	1	17	1
		?	-	-	7	1
	LR	F	2	5	-	1
		M	1	1	-	-
		?	-	-	2	-
	not genotyped	F	-	-	1	-
		M	1	-	1	-
	Total progeny analyzed			19		73

Рисунок 5.12. Склад потомства самиць LLR-*P. esculentus* та самців *P. ridibundus* з Кременної та Брусівки. «—» позначає відсутність певної форми у вибірці; «?» – відсутність впевнено ідентифікованих статевих ознак у особин.

Потомства і брусівських, і кременської пар містили лише гібридів *P. esculentus*, жодного *P. ridibundus* серед них не було знайдено. Ці гібриди були представлені як диплоїдними (LR) так і триплоїдними (LLR) формами, кожна з яких була представлена і самицями, і самцями.

Майже всі кременські цьогорічки (окрім двох) були самицями з генотипом LLR. Виключення становили цьогорічок-самець з генотипом LLR та цьогорічок-самиця з генотипом LR. Також генотип LR мали два пуголовки на ранніх етапах розвитку (25 та 30 стадії).

Якщо порівняти кременських пуголовків на стадіях розвитку, співставних з такими у брусівських вибірках (стадії 28-37), можна відмітити набагато вищу долю диплоїдів серед брусівських пуголовків: 47% в середньому (37% у кладці А та 60% в кладці В) проти лише 4% в кременському потомстві.

Співвідношення статей пуголовків між різними системами відрізнялося незначуще і за порівняння всіх пуголовків разом ($p=1$), і за порівняння лише генотипованих гібридів ($p=0.773$), і за порівняння лише LLR-пуголовків ($p=0.717$). На тих самих стадіях розвитку (див. вище) співвідношення статей у

кремінських пуголовків було близьким до 1:1 (10 самиць:11 самців), в той час як серед брусівських спостерігалася різна картина: 1:4 у кладці А, 3:1 у кладці В.

Співвідношення статей значуще відрізнялося між пуголовками та цьогорічками кремінського потомства і якщо порівняти всіх особин (генотипованих або ні), генотипованих гібридів чи лише LLR-гібридів ($p < 0.001$ в усіх випадках). А ось різниця співвідношень статей між LLR-цьогорічками та LLR-ювенілами з природних систем була незначуща якщо порівняти і з ГПС Кремінної, і ГПС Брусівки ($p > 0.05$ в обох випадках).

Отримані на дорослих жабах результати свідчать про те, що ГПС Кремінної та Брусівки складаються з обох статей *P. ridibundus* та триплоїдних самиць LLR-*P. esculentus*. Вибірки ювенілів з обох систем містили менше форм, ніж виявлено серед дорослих (лише самиці *P. ridibundus* та LLR-*P. esculentus* в Кремінній та лише *P. ridibundus* в Брусівці) – але без жодних інших форм, які б не були зареєстровані серед дорослих. А ось експериментальне потомство гібридів з обох цих систем включало в себе незареєстровані серед дорослих форми: LR- та LLR-самці і LR-самиці; *P. ridibundus* в потомстві гібридів не були знайдені.

Триплоїдні самиці у ГПС Кремінної та Брусівки, будучи єдиними гібридними формами, мають, отже, повністю залежати в своєму відтворенні від самців озерних жаб. Оскільки не було знайдено жодних особин *P. ridibundus* серед потомства таких самиць, слід припустити, що LLR-*P. esculentus* в цих системах не продукують яйцеклітин з R-геномом (див. також [Fedorova і Shabanov 2022](#)). Щоправда, це припущення більш вагоме у випадку самиці з Кремінної, бо для неї прогенотиповано 71 потомок, ніж для брусівських самиць з невеликою кількістю генотипованого потомства.

Особливості гаметогенезу LLR-самиць в цих системах є предметом подальших досліджень. Однак, спираючись на отримані дані, дві гіпотези

можуть пояснити наявність одночасно диплоїдних LR- та триплоїдних LLR-потомків:

- 1) продукування ними суміші гаплоїдних L-гамет та диплоїдних LL-гамет;
- 2) продукування L-гамет з подальшим подвоєнням L-геному в частині ікри після запліднення.

Перший сценарій не є унікальним для *Pelophylax esculentus* complex з жодної перспективи. Продукування гаплоїдних гамет з геномом, який особина має в двох копіях – відомий та типовий спосіб гаметогенезу триплоїдів і LLR, і LRR (Ditte G Christiansen 2009; N. B. M. Pruvost et al. 2015; D. Dedukh et al. 2020). У повністю-гібридних системах (без батьківських видів) триплоїди відіграють роль батьківських форм, продукуючи рекомбінантні гаплоїдні гамети (Christiansen і Reyer 2009; Pruvost et al. 2015). LLR-триплоїди з популяційних систем басейну Сіверського Донця також відомі продукуванням в основному L-яйцеклітин – хоча також відомі випадки продукування ними і R-гамет, і суміші L- та R-гамет (Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2017).

LLR-триплоїди також відомі здатністю продукувати LL-гамети – такі випадки були зареєстровані для північноєвропейських ГПС, де LLR-гібриди обох статей продукують суміш L- та LL-гамет (до 42% останніх у однієї конкретної самиці) (Christiansen 2009). Дослідження показали, що LL-гамети утворюються внаслідок елімінації R-геному, а L-гамети – ще й внаслідок мейозу (Christiansen 2009).

В той же час, в деяких центральноевропейських ГПС LLR-особини передають виключно клональні LL-гамети, «паразитуючи» таким чином у своєму відтворенні на донорах R-гамет (зазвичай LR-*P. esculentus*). Втім, такі випадки відомі лише для LLR-самців ((Mikulíček et al. 2015; Pruvost et al. 2015).

Другий сценарій передбачає подвоєння L-геномів в L-яйцеклітинах після запліднення. Існують свідчення поліплоїдизації ікри амфібій внаслідок експозиції її певному фізичному впливу – за рахунок пригнічення формування другого полярного тільця (Cassidy і Blackler 1980; Pollack і Maheras-Rarick

1990; Kondo 2002; також див. Schmid, Evans, і Bogart 2015). Не варто виключати, що механізми, які дозволяють розвиток організму після зовнішнього втручання і подвоєння геномів внаслідок нього, можуть бути залучені і у цілком природні процеси.

Результати мікросателітного аналізу частково пояснюють розмноження триплоїдів у Кременній та Брусівці.

Матері експериментальних кладок були гомозиготні за всіма локусами, і тому точно визначити характер продукованих ними гамет не видається можливим. Гомозиготними, не дивлячись на наявність поліморфних локусів у L-геномах, були й майже всі інші гібридні самиці – окрім 4 дорослих гібридних самиці (3 з Кременної та 1 з Брусівки), що виявилися гетерозиготними. Вони мали по 2 L-специфічних алеля в локусі Prer4.7, який первинно був описаний для *Pelophylax perezi* (батьківського виду іншого геміклонального комплексу, див. пункт 1.1). Темп виникнення нових мутацій в мікросателітних локусах невисокий (Vulut et al. 2009), тож виникнення алелів *de novo* при реплікації геному після запліднення (другий сценарій) не видається вірогідним. Це приводить нас до припущення, що як мінімум ці 4 гібридні самиці розвинулися з зиготи, утвореної LL-яйцеклітиною.

Різноманіття R-геномів виявилось очікувано вищим за таке L-геномів: uNe та Na були в 3.7-5.7 разів вища (Рис. 5.10). Ці геноми також продемонстрували багато унікальних MLG в генетичному пулі як озерних жаб, так і гібридів. І навпаки, вище LD, нижча Div та небагато ліній MLG підтверджують високу клональність серед L-геномів. Певний рівень клональності був зафіксований також серед R-геномів у гібридів (кілька пар ідентичних MLG) – цей феномен ще має бути досліджений.

Знижене різноманіття L-геномів є очікуваним за відсутності *P. lessonae* у всьому центрі різноманіття. Втім, іншою гіпотетичною опцією могла б стати рекомбінація таких геномів у триплоїдних LLR-гібридів, яка відома для цієї форми – щоправда, з північноєвропейських популяцій. Але навіть якщо такий

процес відбувається – він не амортизує спостережувану високу клональність L-геномів в цих системах. Можливо тому, що потомству насправді передаються лише диплоїдні LL-гамети (перший сценарій).

Після запліднення, деякий незрозумілий механізм (чи кілька механізмів) сприяє зникненню самців всіх генотипів та LR-самиць. Дія цього механізму не суворо детермінована, оскільки ми бачимо варіабельність його проявів серед різних потомств. Наприклад, диплоїдні особини є рідкісними серед кремінського потомства – і в той же час складають доволі помітну частку в брусівських кладках. Співвідношення статей також суттєво коливається серед трьох кладок – хоча, враховуючи XY-систему визначення статі, що припускається для зелених жаб (Berger, Uzzell, i Hotz 1988; Schempp i Schmid 1981; Christiansen 2009), кількості X- та Y-гамет мали б бути рівними у батьків-*P. ridibundus*, а отже і співвідношення статей в потомстві мало б бути близьким до 1:1. Частина потомства, що зависла у розвитку, містить в собі лише LLR-особин – але 6 самців та 3 самиць. Можливо, це прояв механізму елімінації самців (або тільки LLR-самців).

У потомстві пари з Кремінної LR-пуголовки зустрічаються лише на ранніх стадіях, а серед старших пуголовків фіксувалися лише LLR. Це могло б слугувати доказом відбору проти генотипу LR на ранніх стадіях розвитку (25-30) – але серед брусівської кладки (старшої за стадією розвитку) ця форма реєструється в суттєвій частці. До того ж, треба визнати, що дія механізмів елімінації і самців, і носіїв LR-генотипу має бути розтягнутою аж до метаморфозу і навіть далі – оскільки ми спостерігаємо і LLR-самця, і LR-самку серед цьогорічок. Вживання і статеве дозрівання диплоїдних (LR) гібридів могло б пояснити деякий рівень клональності, виявлений серед R-геномів, оскільки LR-гібриди відомі здатністю передавати клональний (R)-геном у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття – але виявлений LR-цьогорічок є самицею, а ця форма навряд би доклалася до появи LLR-самиць в схрещуваннях з *P. ridibundus*, з огляду на відомий гаметогенез таких гібридів

(LR-, R-, RR-гамети; Christiansen 2009; Dedukh et al. 2015; Dedukh et al. 2017). LLR-самці теж навряд чи доживають до зрілості в цих системах, оскільки жодних ознак присутності самців *P. esculentus* не було зареєстровано протягом польових досліджень.

На основі результатів поточного дослідження була запропонована схема відтворення у ГПС Кремінної та Брусівки (Рис. 5.13).

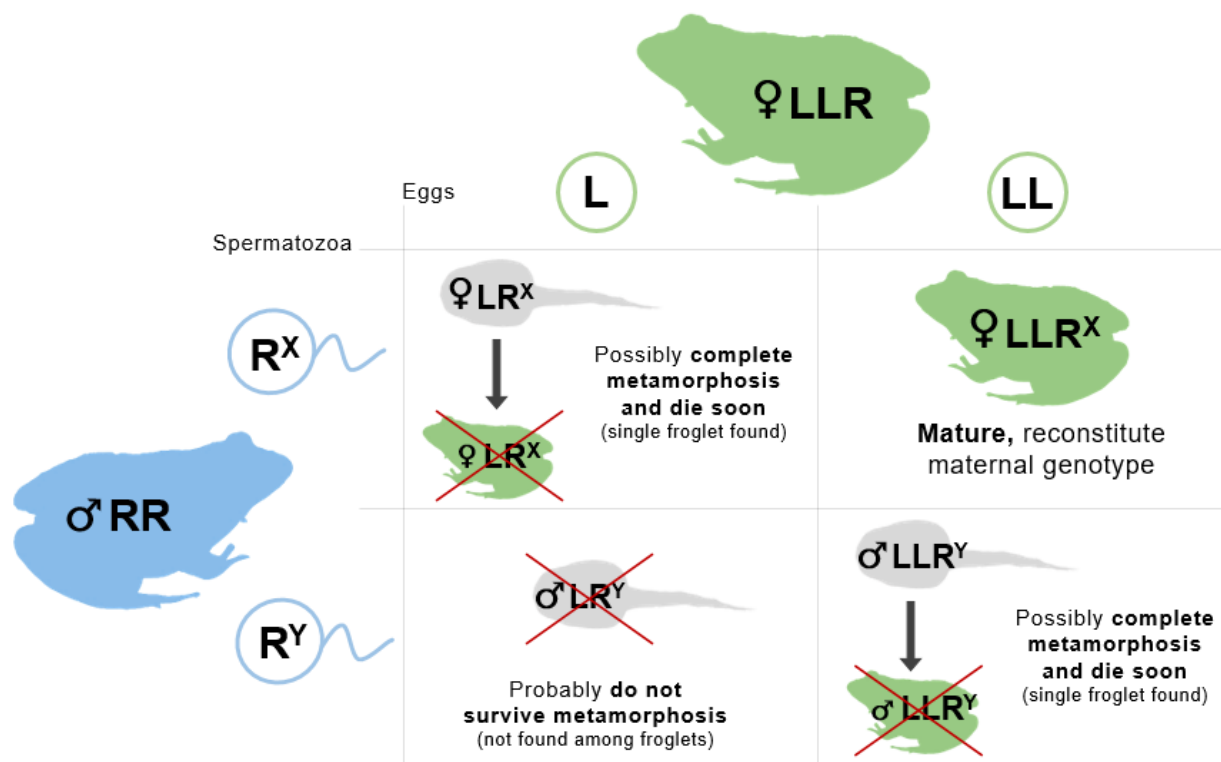


Рисунок 5.13. Пропонована схема відтворення у ГПС Кремінної та Брусівки.

Надрядкові «X» та «Y» позначають стать R-геномів; стать L-геномів невідома. Червоні перехрестя означають елімінацію даної форми.

З певного погляду, спосіб відтворення LLR-самиць з Кремінної та Брусівки нагадує спосіб відтворення триплоїдів з L-E ГПС у Центральній Європі, де LLR-триплоїди також представлені однією статтю (самці). Вони так само залежать від гаплоїдних R-геномів (від диплоїдних гібридів). І вони не докладаються до відтворення батьківського виду *P. lessonae* так само, як кремінські/брусівські гібриди не докладаються до відтворення *P. ridibundus* в цих системах – оскільки ми не бачимо жодного *P. ridibundus* у проаналізованому потомстві. Втім, судячи з наявності LR-потомства,

кремінські/брусівські гібридні самиці здатні продукувати L-гамети – чи навіть лише їх (з огляду на гіпотетичні сценарії відтворення, див. вище). Центральньо-європейські LLR-самці, гіпотетично, «репродуктивно паразитують» за рахунок того, що один з їхніх L-геномів, що передаються парюю, є Y-геномом. Так само на Y-зчепленому наслідуванні геномів ґрунтується відтворення гібридів в ГПС на річці Одер (Doležalková-Kašánková et al. 2021).

У Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття відома ще одна ГПС, де триплоїди представлені лише LLR-самицями – це ГПС с. Замулівка (колишнє Жовтневе) (Meleshko, Korshunov, i Shabanov 2014; Dedukh et al. 2015; Biriuk et al. 2016). Щоправда, там такі триплоїди співіснують, окрім батьківського виду *P. ridibundus*, ще й з обома статями диплоїдних LR-*P. esculentus*. І LLR-самиці, і LR-самиці в цій ГПС продукують гаплоїдні гамети з обома батьківськими геномами, L та R (Dedukh et al. 2015, Biriuk et al. 2016). Відтворення триплоїдів в цій системі має залежати від диплоїдних гамет – можливо, від LR-самців, можливо, від якихось самиць, – але детальних досліджень гаметогенезу з аналізом результатів схрещувань тут не проводилося. Відсутність LLR-самців, гіпотетично, вказує на механізми елімінації самців, споріднені до таких в ГПС Кремінної та Брусівки.

Внутрішньо-популяційний добір в геміклональних популяційних системах Кремінної і Брусівки належить до досі неописаного, нового типу. Він ґрунтується на особливому способі розмноження LLR-самиць (можливо, продукуванні кількох типів гамет) та добору одночасно проти однієї статі (самців) та певного генотипу (LR). Це призводить до існування ГПС, де одна-єдина гібридна форма відтворюється, використовуючи батьківський вид.

5.4. Характер добору в ГПС Журавлівського Гідропарку

Геміклональна популяційна система Журавлівського Гідропарку (р. Харків, м. Харків) складається з озерних жаб та диплоїдних гібридів, серед яких відмічені переважно самці.

Для дослідження характеру відтворення і відбору в даній системі, був застосований оригінальний метод експериментального штучного схрещування (пункт 4.2). Самиця *P. ridibundus* та самець *P. esculentus* були добуті 20.06.2023 на березі річки методом ручного лову з застосуванням ліхтарика та герпетологічного сачка. Задля стимулювання дозрівання гамет, обидві тварини отримали ін'єкцію «Сурфагона» в кількості 2 мл: самиця за добу, а самець за 2 години до запланованого схрещування. В зазначений час гамети були отримані нетравматичним для кожної тварини шляхом: ікра – обережним вичавлюванням в чашку Петрі, сперма – промиванням клоаки, у вигляді суспензії, – та змішані для запліднення.

Ікра, а потім пуголки, метаморфи і цьогорічки розвивалися в пластикових контейнерах з відстояною водою, з постійною аерацією. Потомство було проаналізовано за допомогою методу каріології метафазних пластинок, мікросателітного аналізу та аналізу видоспецифічних SNP; для частини потомства була виміряна середня довжина еритроцитів.

Загальна кількість спостережуваного потомства – 53 особини. Розвиток потомства зайняв від 57 (найранніший метаморф) до 99 днів. Частина, що загальмувала у своєму розвитку на стадії пуголка навіть після 102-106 днів розвитку – складала 26 особин. У всіх статі була визначена за морфологією гонад (Ogielska 2009).

За допомогою мікросателітів (ті ж локуси, що й у пункті 5.3) аналізувалися всі особини, що пройшли метаморфоз, а також деякі пуголки, та особини з тої частини потомства, що загальмувала розвиток – сумарно 24 пуголки та цьогорічки. Результати представлені на Рис. 5.14. Серед потомства виявили представників і *P. esculentus*, і *P. ridibundus*. Враховуючи, що матір'ю

потомства була озерна жаба, що здатна продукувати лише R-яйцеклітини, цей результат беззаперечно свідчить про амфіспермічність гібридного самця-батька потомства, тобто продукування ним як R-, так і L-сперматозоїдів.

Species	Sex	Age	
		tadpole	juvenile
<i>P. ridibundus</i>	female	5	7
	male	-	-
<i>P. esculentus</i>	female	-	-
	male	1	11

Рисунок 5.14. Вид, стать та вік потомства пари з Журавлівського Гідропарку, проаналізованого за допомогою мікросателітів.

Вважається, що у зелених жаб визначення статі відбувається за ХУ-системою, тобто (диплоїдні) самиці є гомогаметними з точки зору «статі» геномів, що вони передають потомству (наприклад, Eggert 2004). Серед проаналізованого потомства усі RR-особини виявилися самицями, а усі LR-особини виявилися самцями. Отже, Y-геномом у даного гібрида є саме L-геном.

За відсутності батьківського виду *P. lessonae* кількість клональних ліній L-геному неминуче скорочується – бо нема джерела нових алелів та рекомбінантних геномів (М. О. Drohvalenko et al. 2023). Журавлівський Гідропарк містить біотопи, що набагато більше підходять озерним жабам, ніж гібридам: обширні відкриті ділянки водного плеса з порівняно крутими берегами з вузьким чи відсутнім мілководдям, що в сумі не сприяють виживаності гібридів. Отже, враховуючи неминучий дрефт (що скорочує генетичне різноманіття L-геномів) та загальну невисоку чисельність гібридів (ймовірно, через неоптимальні умови) – можна припустити, що всі чи більшість L-геномів, що циркулюють в ГПС Журавлівського Гідропарку, є Y-геномами. Це пояснює спостережуване серед гібридів абсолютне переважання (чи виключну наявність) в цій системі лише самців *P. esculentus*.

Тож, диплоїдні LR-гібриди відтворюються тут за рахунок самиць озерної жаби (RR), сприяючи відтворенню їхнього пулу також R-геном, таким чином, має змінювати тут свій статус з рекомбінуючого (в гаметогенезі озерних жаб) на клональний (в гаметогенезі гібридів), як це вже було показано для деяких популяційних систем (Doležalková-Kaštánková et al. 2021). Самці озерних жаб відтворюються тут, вочевидь, як окремий, подібний до гібридів, генетичний пул, так само залежачи від самиць озерних жаб.

Не вдалося зафіксувати жодного триплоїда у складі описаної ГПС. Для 10 з 12 гібридів, проаналізованих мікросателітним аналізом, були отримані метафазні пластинки – всі вони виявилися диплоїдами. Триплоїди гіпотетично мали б утворюватися з диплоїдних гамет, що здатні продукувати деякі гібриди, в тому числі в Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття – однак, їх продукція зареєстрована переважно для гібридних самиць (Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2015, Dedukh et al. 2017), які як мінімум рідкісні в Журавлівському Гідропарку. Мікросателітний аналіз мав би зафіксувати серед потомства триплоїдів з геномним складом LRR, бо R-геноми у RR-матері та LR-батька відрізнялися за набором алелів – тобто, продукція LR-гамет LR-самцями виключається. RR-гамети утворили б після запліднення RRR-особин – які вважаються нежиттєздатними (Nicolas B. M. Pruvost, Hollinger, і Reyer 2013), – а тому їх наявність можна було не зареєструвати, маючи справу з потомством, що дожило до метаморфозу. Продукування LL-гамет для Сіверсько-Донецького центру різноманіття припускається лише для LLR-самиць у ГПС Кременної та Брусівки (Drohvalenko et al. 2023), а також для єдиного диплоїдного гібрида (Pustovalova et al. 2022).

Серед особин, що загальмували в своєму розвитку, кількість самиць була в 4 рази більшою за кількість самців (20 : 5). Вважаючи усіх самиць представниками *P. ridibundus*, можна припустити дію певного механізму добору, що у потомстві *P. esculentus* знижує життєздатність переважно для *P. ridibundus*. Наприклад, це може бути вплив взаємодії клонального (R)- та

сексуального R-геномів, отриманих від двох батьків (Reyer, Arioli-Jakob, і Arioli 2015).

5.5. Характер добору в ГПС с. Тимченки

Шляхом трьохрічного аналізу вибірок дорослих та ювенільних зелених жаб зі штучного притерасного ставка було виявлено, що геміклональна популяційна система, що населяє заплавні водойми річки Мож в околицях с. Тимченки, складається з батьківського виду *P. ridibundus* та диплоїдних і триплоїдних гібридів *P. esculentus* – кожна форма представлена обома статями (Рис. 5.15) (пункт 3.5.5).

Species, sex, ploidy, and age of analyzed water frogs by years. Dash line denotes the absence of correspondence age in some samples; zero denotes the forms which were not observed.

Form of water frog			Year of sample		
Ploidy	Species	Sex	2019	2020	2021
Diploid (2n)	<i>P. esculentus</i>	Male	–	43	47
		Female	–	0	1
	<i>P. ridibundus</i>	Male	–	0	3
		Female	–	1	12
	Juveniles (undefined species)	Male	18	–	10
		Female	5	–	18
Triploid (3n)	<i>P. esculentus</i>	Male	–	2	0
		Female	–	0	0
	Juveniles (<i>P. esculentus</i>)	Male	2	–	1
		Female	2	–	0
Overall			27	46	92

Рисунок 5.15. Вид, стать, вік та плоїдність досліджених зелених жаб з с. Тимченки; «-» означає відсутність жаб відповідного віку у вибірці даного року (за Drohvalenko et al. 2021)

Характерно, що для цієї системи показана наявність триплоїдних особин лише LLR-геномного складу (Drohvalenko et al. 2021). Такі триплоїди можуть утворюватися при злитті пари з або LR- та L-гамети, або LL- та R-гамети – в будь-якому випадку потрібен донор диплоїдних гамет.

Гаплоїдні гамети типові для диплоїдних гібридів, більш того – в Сіверсько-Донецькому центрі розповсюджене явище амфігаметичності, яке полягає у продукуванні гібридами суміші різних гамет, в першу чергу гаплоїдних, і серед самиць, і серед самців (Doležalková et al. 2016; Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2015; Dedukh et al. 2017). Для самців диплоїдних гібридів конкретно з цього локалітету відома амфіспермія – а саме продукування гамет з геномами обох батьківських видів в широкому діапазоні співвідношень різних типів гамет у різних тварин.

Але також для одного LR-самця з локалітету Тимченки зареєстровані ознаки сперматогенезу, що можуть вести до формування диплоїдних сперматозоїдів гіпотетично будь-якого складу: RR, LR чи LL (Pustovalova et al. 2022). З іншого боку, продукування диплоїдних яйцеклітин диплоїдними гібридними самицями теж відоме для басейну Донця (Dedukh et al. 2015; Dedukh et al. 2017).

Дані щодо гаметогенезу триплоїдів в Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття свідчать про переважну продукцію ними гаплоїдних гамет з таким геномом, який самі мають у подвоєному вигляді (Biriuk et al. 2016; Dedukh et al. 2015). Однак, спостерігалися окремі виключення з цього «правила», як-от продукція LLR-самицею R-яйцеклітин або продукція LLR-самицею LR-яйцеклітин (Dedukh et al. 2015) – або ж вірогідне продукування LLR-самицями суміші гаплоїдних L- та диплоїдних LL-яйцеклітин (Drohvalenko et al. 2023).

Якщо триплоїди в заплаві річки Мож практикують найрозповсюдженіший в басейні Сіверського Донця тип гаметогенезу, а для диплоїдних гібридів припустити все досліджене (в т. ч. і на цій системі) різноманіття гаметогенезу – то загальну схему розмноження в ГПС с. Тимченки можна представити у вигляді приблизної схеми на Рис. 5.16.

♂ \ ♀		RR	LR				LLR
		R	L	R	LR	RR	L
R ^Y R	R ^Y	RR ^Y	LR ^Y	R ^Y R	LRR ^Y	RRR ^Y	LR ^Y
	R	RR	LR	RR	LRR	RRR	LR
L ^Y R	L ^Y	L ^Y R	LL ^Y	L ^Y R	L ^Y LR	L ^Y RR	LL ^Y
	R	RR	LR	RR	LRR	RRR	LR
	RR	RRR	LRR	RRR	LRRR	RRRR	LRR
	L ^Y L ^Y	L ^Y L ^Y R	L ^Y L ^Y L	L ^Y L ^Y R	L ^Y L ^Y LR	L ^Y L ^Y RR	L ^Y L ^Y L
	L ^Y R	L ^Y RR	L ^Y LR	L ^Y RR	L ^Y LRR	L ^Y RRR	L ^Y LR
	L	LR	LL	LR	LLR	LRR	LL
L ^Y R ^Y	R ^Y	RR ^Y	LR ^Y	RR ^Y	LRR ^Y	RRR ^Y	LR ^Y
	R ^Y R ^Y	R ^Y R ^Y R	L ^Y R ^Y R	R ^Y R ^Y R	LRR ^Y R ^Y	RRR ^Y R ^Y	LR ^Y R ^Y
	LL	LLR	LLL	LLR	LLL	LLRR	LLL
	L ^Y R ^Y	LRR ^Y	LLR ^Y	LRR ^Y	LLR ^Y R	LRRR ^Y	LLR ^Y
	L	LR	LL	LR	LLR	LRR	LL
L ^Y LR	L ^Y	L ^Y R	LL ^Y	L ^Y R	L ^Y LR	L ^Y RR	LL ^Y
	L	LR	LL	LR	LLR	LRR	LL
LLR ^Y	L	LR	LL	LR	LLR	LRR	LL

Рисунок 5.16. Пропонована схема розмноження в ГПС с. Тимченки. Сірим шрифтом позначені форми, не виявлені в даній системі. Кольори встановлюють відповідність наявних форм формам у потомстві; без кольору – гамети.

Цілий ряд форм зелених жаб тут вірогідно здатні до передачі L-геномів (диплоїдні LR-самці та LR-самиці та LLR-триплоїди) – отже, очевидна наявність елімінації постійно виникаючих носіїв генотипу *P. lessonae* (LL).

Також очевидним є те, що тетраплоїдні особини (RRRR, LRRR, LLRR) та автотриплоїди (LLL, RRR) також малоймовірно виживають (Christiansen 2009; (Nicolas B. M. Pruvost, Hollinger, і Reyer 2013; Nicolas B. M. Pruvost, Hoffmann, і Reyer 2013). У всьому басейні Донця тетраплоїди були зареєстровані поодинокі лише кілька разів (Borkin et al. 2004), а автотриплоїди не були зареєстровані взагалі.

Триплоїди геномного складу LRR не були виявлені в популяційній системі с. Тимченки. Лишається ймовірність не знаходження їх серед всіх проаналізованих вибірок, за дуже маленької їх частки. Але, враховуючи більшу кількість комбінацій гамет, що сприяють їх появі – наприклад,

переважання R-гамет у диплоїдних самців та самиць гібридів (Dedukh et al. 2015; Pustovalova et al. 2022), – слід все одно припустити існування механізму, що відсіює носіїв LRR-генотипу. З іншого боку, диплоїдні гамети, від яких залежить поява будь-яких триплоїдів, рідкісні в принципі як явище – а тому припущення про інтенсивність елімінації певних форм на основі кількості можливих поєднань гамет носить вкрай гіпотетичний, модельний характер.

Немає єдиного консенсусу щодо механізму визначення статі у зелених жаб, а надто не зрозумілі його прояви у триплоїдних гібридів (Eggert 2004). Тому щодо триплоїдних особин-потенційних носіїв двох Y-геномів не можна зробити однозначних висновків навіть з огляду на усі попередні припущення.

Варто зазначити, що ГПС Тимченків може бути еволюційно пов'язана з ГПС Іськова ставка (див. пункт 5.1), оскільки обидві водойми належать до басейну річки Мож. Втім, вже на рівні складу очевидно, що ці системи різні: в Іському ставку LLR-триплоїди завжди були рідкісні і не були виявлені за період молекулярних досліджень, наведених в цій роботі – в той час як у Тимченках LLR-триплоїди, нехай рідкісні, але становлять єдину форму триплоїдів. Також в Тимченках куди звичайнішими є представники *P. ridibundus* (пункт 3.6). А ще в ГПС Тимченків можна з впевненістю стверджувати про можливий вклад диплоїдних гібридних самців у відтворення триплоїдів, тоді як у Іському ставку це питання є дискусійним – і, відповідно, нема підстав підозрювати елімінацію стількох триплоїдних чи тетраплоїдних форм у потомстві. Окрім того, в Тимченках, судячи з усього, не відбувається (чи відбувається меншою мірою) елімінація *P. ridibundus*.

Висновки Розділу 5

- Шляхом поєднання досліджень складу природніх ГПС та аналізу експериментального потомства описані особливості розмноження і добору, який діє на ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття

зелених жаб, а саме ГПС Іськова, Корякова ставків, ставка в с. Тимченки, заплачних озер м. Кременна та с. Брусівка і Журавлівського Гідропарку.

- Вперше детально описано склад, вірогідний спосіб розмноження та характер добору у ГПС дотепер слабо вивченого R-Erf типу у м. Кременна та с. Брусівка. Ці системи представляють собою унікальний спосіб існування *P. esculentus* complex, де нетиповий для регіону гаметогенез триплоїдних самиць та добір проти самців і диплоїдних гібридів у їхньому потомстві з покоління в покоління підтримує склад системи з *P. ridibundus* обох статей та ♀LLR-*P. esculentus*.
- Показано зв'язок генетичного різноманіття геномів різних видів зі способом відтворення, а отже і добору в R-E-Erf ГПС Іськова ставка, що, вочевидь, відбувається протягом всього онтогенезу потомства гібридів.
- Запропоновано схему дії механізмів відтворення та добору серед потомства для R-E ГПС Журавлівського Гідропарку та R-E-Erf ГПС Корякова ставка і ставка в с. Тимченки. Для цих систем продемонстровано добір проти одного чи обох батьківських генотипів, а також проти гібридних диплоїдних та різних форм триплоїдних генотипів.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відомості стосовно різноманіття геміклональних популяційних систем України щороку поповнюються – нові локалітети описуються, бази даних щодо відомих систем уточнюються та доповнюються. Поточна картина дає розуміння, що це різноманіття досі вивчене явно недостатньо або, принаймні, уривчасто: біогеографія, екологія та популяційна біологія ГПС північного сходу досліджена порівняно добре, в той час як уявлень і про розповсюдження, і про складність систем з інших регіонів України – вкрай бракує. З огляду на все нові й нові відкриття навіть у ретельно вивченому басейні Сіверського Донця, вивчення ГПС всієї країни відверто необхідне. Застосування просунутих сучасних методів ідентифікації видів та окремих геномів спростить і пришвидшить виконання цієї задачі.

Наявні дані щодо онтогенезу дають підстави сподіватися на описання надійних морфологічних рис для ідентифікації різних генетичних форм зелених жаб навіть впродовж раннього розвитку. В той же час, зареєстровані аномалії росту і розвитку вказують на суттєву мінливість поміж різними ГПС – це водночас ускладнює попередню задачу, але й дає підказки щодо внутрішньо-популяційних процесів, що безпосередньо пов'язані з еволюцією і стійким існуванням геміклональних популяційних систем як таких. Нові дослідження явно мають оперувати більшими і різноманітнішими вибірками.

Масштабні бойові дії війни з росією вже нанесли непоправну шкоду природним оселищам багатьох видів, так само як і природоохоронним територіям. Найскладніші та найцікавіші з відомих ГПС, що потенційно приховують ще нерозкриті таємниці на клітинному та молекулярному рівнях, розповсюджені біля р. Сіверський Донець та р. Прип'ять, населяючи численні природоохоронні території рівня від заказника до біосферного заповідника. І саме ці регіони були окуповані, досі окуповані або страждають від постійних

бойових дій. Механічне знищення та забруднення об'єктів живої природи, небезпека від залишків бойових пристроїв – це неповний перелік наслідків процесів, що відбуваються прямо в цю хвилину і ускладнять дослідження на роки вперед. Стратегії подальших біологічних досліджень, як і порятунку вже наявних унікальних колекцій з даних територій мають формуватися вже зараз.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено склад окремих ГПС в 10 областях України та в басейнах таких найкрупніших річок як Західний Буг, Дунай, Дніпро та Сіверський Донець. Вивчені ГПС містять усі три форми українських зелених жаб: два види *P. lessonae* та *P. ridibundus*, а також їхній геміклональний гібрид *P. esculentus*, – та належать до таких типів: L-E, R-E, R-E-Ep, L-E-R, L-E-Ep-R та R-Epf.
2. Виявлено нові осередки поширення триплоїдних *P. esculentus* у вже відомих та новоописаних ГПС: притоки р. Прут (м. Чернівці), район р. Прип'ять (Чорнобильська Зона), дельта Дніпра (м. Гола Пристань), притоки Дніпра (р. Мерла), околиці м. Львів, притоки р. Сіверський Донець поза R-E-Ep субрегіону (р. Мож, р. Мерефа, р. Жихорець).
3. Виявлено цілком нові осередки поширення диплоїдних *P. esculentus* у басейні р. Оскол (м. Дворічна, НПП «Дворічанський»).
4. Для п'яти ГПС Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб (ставки Іськів, Коряків та в с. Тимченки, м. Кремінна та с. Брусівка, Журавлівський Гідропарк) детально описано особливості розмноження і добору серед різних генетичних форм у їхньому складі та запропоновано схеми відтворення у них. Сумарно зазначені особливості добору включають добір проти батьківських видів (*P. lessonae*, *P. ridibundus*), добір проти диплоїдних або триплоїдних (в деяких ГПС – проти певного генотипу) *P. esculentus*, добір проти самців. Особливості розмноження включають амфіспермічність та/чи амфігаметичність гібридів (і диплоїдних, і триплоїдних), продукування гаплоїдних та диплоїдних гамет гібридами, повна залежність відтворення певних форм гібридів від батьківського виду.

5. Вперше детально описано склад, тип розмноження та особливості добору в унікальній ГПС R-Epf-типу біля м. Кремінна та с. Брусівка. Виявлено, що триплоїдні самиці LLR-*P. esculentus* відтворюються тут за рахунок схрещування виключно з самцями *P. ridibundus* та добору серед потомства, що елімінує всіх самців та всіх диплоїдів. Генетичне різноманіття в ГПС та аналіз потомства дозволяє припустити два варіанта відтворення LLR-гібридів: продукування двох типів гамет чи подвоєння геномів після запліднення.
6. За результатами багаторічних досліджень п'яти ГПС басейну Сіверського Донця (Іськів, Коряків, Добрицький ставки, с. Тимченки та с. Замулівка) зареєстровано мінливість систем, що належать до R-E-Epf типу. А саме: за складом трьох генетичних форм зелених жаб всі ГПС відрізнялися значущо; діапазони багаторічної мінливості часток кожної з форм відрізняли системи лише по диплоїдних *P. esculentus*; траєкторії складу кожної ГПС виявилися унікальними. і Розміри диплоїдних і триплоїдних еритроцитів значуще варіювали в досліджених ГПС; розміри тіла значуще варіювали між ГПС та різними формами зелених жаб; в 3 ГПС (Коряків, Замулівка, Іськів) розмір тіла корелював з розміром еритроцитів.
7. Виявлені якісні та кількісні морфологічні відмінності розвитку пуголовків різних форм зелених жаб, а саме якісні (забарвлення частин тіла) та кількісні (набір промірів тіла) пуголовків молодшого віку, що, будучи аналізовані у комплексі, дозволяють розрізняти два батьківські види, а також диплоїдних та триплоїдних гібридів.
8. Показано наявність аномалій росту та розвитку зелених жаб у кількох природніх ГПС та в серед потомства штучних експериментальних схрещувань. Вірогідно, такі аномалії вносять певний внесок у процес елімінації носіїв певного генотипу – процес, характерний для всіх геміклональних популяційних систем. Зареєстровані аномалії

включають в себе загальмованість розвитку, вади розвитку, аномалії розвитку кінцівок та гетерохронія розвитку. Виявлені фенологічні особливості різних форм *P. esculentus* complex, а саме: пролонгований строк розмноження батьківських видів та гібридів та пролонгований розвиток потомства, – вірогідно, розширюють екологічну пластичність розмноження у різних типах ГПС.

ПОДЯКИ

Автор волів би висловити вдячність багатьом людям, що так чи інакше сприяли дослідницькій роботі. Серед них першому слід подякувати науковому керівнику Шабанову Дмитру Андрійовичу за всю підтримку з самого початку наукового шляху. Також якнайбільшої подяки заслуговують всі інші колеги автора з лабораторії Популяційної екології амфібій Олексій Коршунов, Ольга Бірюк і Марина Кравченко за всебічне сприяння різноманітній діяльності. Окрему і щирю вдячність автор висловлює колежанкам-аспіранткам Анні Федоровій та Елеонорі Пустоваловій за весь величезний об'єм спільної роботи, взаємовиручки, компанію в експедиціях та неоціненну допомогу у лабораторних дослідженнях. Також вдячності заслуговують всі інші викладачі та колеги з біологічного факультету ХНУ імені В.Н. Каразіна та кафедри Зоології та Екології Тварин, що вчили, допомагали, консультували або підтримували впродовж всієї аспірантури. Подяка також висловлюється всій сукупності колег-герпетологів і біологів за всю поміч і поради. Успіхом окремих досліджень та/чи експедицій автор зобов'язаний безпосередньому та турботливому сприянню з боку людей, що також заслуговують на визнання, і серед них: Зоя Бондаренко з НПП «Слобожанський»; колектив НПП «Дворічанський»; Анатолій Подобайло, Надія Миленко, Віталій Казанник, водій Руслан та весь колектив НПП «Пирятинський»; Максим і Катерина Конюхи та Олена Міськова в РЛП «Сеймський»; знавець Буковини Назар Смірнов з родиною; директор біостанції «Вакалівщина» Олександр Говорун та експедиційні компаньони Ольга Сіра, Валерій Дармостук і Тетяна Жебіна; Денис Вишневський, Сергій Домашевський та весь колектив РЕБЗ «Чорнобильський»; колектив, а зокрема егері Петро та Володимир з родинами з БЗ «Чорноморський»; власник турбази «Лісова Казка» Андрій та таксист Толік з м. Кременна; Євген Бульба з с. Тимченки; Юрій та Василина Струс зі

Львова. Автор найщирішим чином вдячний за безкорисливу і терплячу підтримку у дослідженнях і керівництво у окремих проектах Олександром Зіненку, Масієм Рабіжан та Peter Mikulíček; Дмитру Дедуку і Глібу Мазепі за безпосереднє чи опосередковане сприяння лабораторним дослідженням; Олексію Марущаку за різнобічну дружню допомогу. Безперечно, вдячності заслуговують всі друзі, що добродійно або з цікавості склали автору компанію чи долучалися до збору матеріалу будь-якого роду, серед яких Роман Трохимчук, Роксана Макарян, Михайло Шлахтер, Павло Отряжий, Анастасія Михайленко, Анастасія Кисіль, Ігор Бірюк та багато інших чудових людей. Велику подяку автор присвячує усім причетним до організації та учасникам літньої «гайдарівської» практики, яка започаткувала багато чудових досліджень і привнесла не менше чудових хвилин у життя науковця. Автор зобов'язаний також кожному, хто виказав підтримку у важкі часи повномасштабної війни в Україні. Наостанок автор висловлює найтеплішу вдячність своїй родині, без якої будь-яка діяльність була б неможлива.

І, звісно, безмежна вдячність висловлюється всім захисникам України, без чийх зусиль і жертв ця робота не мала б результатів і сенсу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Афоничева, Я.В., А.А. Бондарева, Е.В. Баланюк, і Ю.С. Бибик. 2010. «Изучение соответствий между стадиями развития задних конечностей и ротовых аппаратов в ходе нормального развития головастиков зеленых лягушек». В *Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*, 337–38. Харків: Оперативна поліграфія.
2. Банников, А.Г., И.С. Даревский, і А.К. Рустамов. 1971. *Земноводные и пресмыкающиеся СССР*. М.: Мысль.
3. Баран, Ю.М., А.Г. Птушко, Е.А. Бешевец, і Е.В. Мелешко. 2013. «Изучение структуры гемиклональной популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Иськова пруда (Змиевской р-н, Харьковская обл.)». В *«Біологія: від молекули до біосфери»*. Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих учених, 229–30. Харків: ФОП Шаповалова Т. М.
4. Белкина, И.О., і О.П. Брилева. 2010. «Различие в пропорциях и размерах головастиков зеленых лягушек, проходящих развитие в разное время». В *Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*, 341–42. Харків: Оперативна поліграфія.
5. Бибик, Ю.С. 2010. «Какие факторы определяют тип ротового аппарата головастиков зеленых лягушек?» В *Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*, 339–40. Харків: Оперативна поліграфія.
6. Бибик, Ю.С., М.С. Коваленко, і А.Г. Кучкова. 2010. «Влияние эффекта группы на развитие головастиков зеленых лягушек». В *Матеріали V*

- Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 338–39. Харків: Оперативна поліграфія.*
7. Булахов, В. Л., В. Я. Гассо, і О. Є. Пахомов. 2007. *Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Земноводні та плазуни (Amphibia et Reptilia)*. Видавництво Дніпропетровського університету. <https://doi.org/10.15421/510701>.
 8. Вакуленко, А.О., Е.В. Мелешко, і А.А. Хазеева. 2014. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Нижнего Добрицкого пруда Змиевского района Харьковской области». В *Матеріали Х Міжнародної конференції молодих учених*, 126–27. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.
 9. Вегерина, А.О., О.В. Бирюк, і Д.А. Шабанов. 2014. «Сравнение устойчивости сперматогенеза у гемиклонального межвидового гибрида *Pelophylax esculentus* и родительского вида *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura)». *Праці українського герпетологічного товариства 5*: 20–28.
 10. Виноградов, А.Е., Ю.М. Розанов, і Л.Я. Боркин. 1990. «Необычный тип нарушенной сперматогенеза у лягушек из Чернобыльской зоны». В *I Международная конференция. Тезисы докладов.*, 124. Зелёный мыс: Москва.
 11. Виноградская, Т.И., А.А. Толокнеева, і Е.В. Комарова. 2010. «Рост и развитие головастиков зеленых лягушек в естественном местообитании». В *Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 344–45. Харків: Оперативна поліграфія.*
 12. Горенский, Г.Г., Д.А. Андреев, К.С. Онищенко, і Э.С. Пустовалова. 2017. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Иськовского пруда Змиевского района Харьковской области». В *Abstracts of the XII International Young*

- Scientists' Conference «Biology: From A Molecule Up To The Biosphere», 132–33. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.*
13. Губенко, В.А., і А.В. Михайлова. 2012. «Сравнение веса и размера головастиков зеленых лягушек из Иського пруда и Северского Донца». В *Матеріали VII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 253–54. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.*
14. Детлаф, Т.А. 1975. *Объекты биологии развития. Проблемы биологии развития. Москва: Наука.*
15. Дрогваленко, Микола, і Анна Федорова. 2022. «Дослідження геміклональних популяційних систем зелених жаб зони відчуження». В *Літопис природи, 5:191–94. Київ: Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник. https://zapovidnyk.org.ua/files-pdf/litopys_2021_tom_5.pdf.*
16. Дрогваленко, М.О., М.О. Кравченко, Р.М. Макарян, Я.В. Степанюк, А.О. Федорова, і Д.А. Шабанов. 2018. «Вибіркова генетична й екологічна смертність різних представників гібридогенного комплексу зелених жаб забезпечує стійкість їхніх геміклональних популяційних систем». В *Proceedings Of The Fifth International Scientific And Practical Conference «Regional Aspects Of Floristic And Faunistic Research». Chernivtsi, Ukraine: Друк Арт.*
17. Дрогваленко, Н.А., і Р.Н. Макарян. 2017. «Состав гемиклональной популяционной системы зелёных лягушек озера Подпесочного (г. Кременная, Луганская область)». В *Всеукр. зоол. конф. (12-16 вересня 2017 р, м. Харків): тези доповідей., 53–54. Харків.*
18. Дрогваленко, Н.А., і А.В. Черненко. 2014. «Сравнение длины и массы тела головастиков зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex), проходящих развитие в пойме Северского Донца и в Иськовом пруду». В *Матеріали X Міжнародної конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», 127–28. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.*

19. Ермаков, Д.В., і Е.С. Тарасенко. 2016. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) из Корякова яра (Змиевской район Харьковской области)». В «*Biology: From A Molecule Up To The Biosphere*». Abstracts of the XI International young scientists ' conference, 137–38. Kharkiv: V. N. Karazin KhNU.
20. Клемперт, О.В., і А.А. Ус. 2012. «В необычной популяционной системе зеленых лягушек размер эритроцитов *Pelophylax esculentus* оказывается связан с полом». В *Мат. VII Міжнар. конф. мол. науковців.*, 260–61. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.
21. Коршунов, О.В. 2010. «Экологические закономерности распределения *Pelophylax esculentus* complex в биотопах бассейна верхнего течения реки Северский Донец». Автореферат Диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Днепропетровск: Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара.
22. Кузьмин, С.Л. 1999. *Земноводные бывшего СССР*. Москва: Товарищество научных изданий КМК.
23. Куриленко, В.Е., і Ю.Г. Вервес. 1999. *Земноводные и пресмыкающиеся фауны Украины: справочник-определитель*. Киев: Генеза.
24. Лада, Г.А. 1998. «О необходимости сохранения уникальных 'чистых' популяций диплоидной съедобной лягушки (*Rana esculenta* Linnaeus, 1758) в Белгородской и Харьковской областях». В *Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. «Проблемы охраны и рационального использования природных экосистем и биологических ресурсов», посвященной 125-летию И.И. Спрыгина*, 333–35. Пенза: Нисса-Поволжье.
25. Лаптий, А.Ю., С.А. Зюбрий, і Е.В. Мелешко. 2013. «Исследование структуры гемиклональной популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) пруда пос. Жовтневое». В *Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих учених*, 243–44. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.

26. Лукан, Р.М., Е.С. Пустовалова, і О.В. Бірюк. 2017. «Метод прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків зелених жаб». В *Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference «Biology: From A Molecule Up To The Biosphere»*, 141–42. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.
27. Макарян, Р.М., О.В. Бірюк, О.В. Коршунов, М.О. Кравченко, О.В. Мелешко, Р.Р. Трохимчук, і Д.А. Шабанов. 2016. «Склад пуголовків зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) в Іськовому ставі (НПП 'Гомільшанські ліси')». В *Матеріали наукової конференції 'Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій'*, 61–64. Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
28. Марущак, А.Ю., Ю.И. Кузьмин, А.С. Осирко, і И.Г. Дмитриева. 2017. «Исследование морфологических аномалий и зараженности гельминтами озерных лягушек, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), в отдельных популяциях города Киева». *Збірник праць Зоологічного музею*, вип. 48: 38–45.
29. Марущак, Олексій. 2022. «Сучасний стан амфібій правобережного Полісся». На здобуття наукового ступеня доктора філософії, Київ.
30. Межжерин, С., С. Морозов-Леонов, О. Ростовская, Д. Шабанов, і Л. Соболенко. 2010. «Плоидность и генетическая структура гибридных популяций водных лягушек *Pelophylax esculentus* (L., 1758) complex (Amphibia, Ranidae) Украины». *Цитология и генетика*, вип. 4: 23–28.
31. Михайленко, А.О., Д.В. Круговой, А.А. Клыса, і Е.В. Мелешко. 2013. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Нижнего Добрицкого пруда Змиевского района Харьковской области». В *Матеріали ІХ Міжнародної конференції молодих учених*, 250–51. Харків: ФОП Шаповалова Т.М.
32. Михайлова, О.В. 2011. «Мозаичность соматических тканей у головастиков представителей *Pelophylax esculentus* complex из

- окрестностей биостанции ХНУ». В *Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців*, 252–53. Харків.
33. Некрасова, О.Д. 2002. «Структура популяций и гибридизация зеленых лягушек *Rana esculenta* complex урбанизированных территорий Среднего Приднепровья: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.08». Киев.
34. Некрасова, О.Д., і Миленко. 2016. «До вивчення герпетофауни національного природного парку ‘Пирятинський’». В *матеріали науково-практичної конференції*, 66–70. Київ: Університет «Україна».
35. Пустовалова, Э.С., Е.Д. Батуева, і Т.С. Харченко. 2015. «Плоидность головастиков зеленых лягушек из Иськова пруда и Корякова яра (Змиевской район Харьковской области)». В *«Biology: From A Molecule Up To The Biosphere». Abstracts of the X International young scientists’ conference*, 183–84. Kharkiv: FLP Sharovalova T. N.
36. Розанов, Ю.М., А.Е. Виноградов, і Л.Я. Боркин. 1990. «Проточная ДНК-цитометрия клеток крови лягушек из Чернобыльской зоны». В *I Международная конференция. Тезисы докладов.*, 139. Зелёный мыс: Москва.
37. Русаченко, Е.Н., А.В. Бондаренко, Р.А. Григоренко, і Е.В. Мелешко. 2016. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Добрицкого пруда Змиевского района Харьковской области». В *«Biology: From A Molecule Up To The Biosphere». Abstracts of the XI International young scientists’ conference*, 147–48. Kharkiv: V. N. Karazin KhNU.
38. Сапожникова, В.А., і И.С. Пырина. 2013. «Отработка методики по изучению влияния метаболитов на рост и развитие головастиков *Pelophylax esculentus* complex». В *Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*, 261–62. Харьков: ФОП Шаповалова Т.М.

39. Скільський, І.В., Н.А. Смірнов, і Л.І. Мелешук. 2015. «Нарис фауни хребетних м. Чернівці». В *Прагматичні аспекти діяльності національних природних парків у контексті збалансованого розвитку: Матеріали міжнар. наук.практ. конф., присвяч. 20-річчю Нац. природ. парку «Вижницький» (17-19 вер. 2015 р., смт Берегомет, Чернівецька обл., Україна)*, 53–77. Чернівці: Друк Арт.
40. Смирнов, Н.А. 2007. «Некоторые вопросы изучения и охраны земноводных г. Черновцы (Украина)». *Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии: Сб. науч. тр.*, 2007.
41. Смирнов, Н.А. 2009. «Распространение и особенности экологии озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Anura, Ranidae) в Прут-Днестровском междуречье Украины». *Праці Укр. герпетол. т-ва.*, вип. 2: 75–80.
42. Смірнов, Н.А., і І.В. Скільський. 2010. «Загибель наземних хребетних тварин на модельній ділянці автодороги в рівнинній частині Буковини». В *Проблеми вивчення й охорони тваринного світу у природних і антропогенних екосистемах. Матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 50-річчю з часу опублікування регіонального зведення «Животный мир Советской Буковины» (м. Чернівці, 13 листопада 2009 р.)*. Чернівці: ДрукАрт.
43. Смірнов, Назар. 2014. «Земноводні передкарпаття та зовнішніх карпат: видовий склад, поширення, мінливість та деякі аспекти екології». Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, Київ.
44. Стах, В., М. Белоконь, І. Хамар, Ю. Белоконь, і О. Решетило. 2014. «Морфологічний та генетичний поліморфізм зелених жаб (*Pelophylax*) водойм Західної України». *Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна.*, вип. 64: 241–49.

45. Стах, В.О., А.А. Боброва, Д.В. Єрмаков, О.В. Мелешко, К.В. Тарасенко, О.В. Коршунов, і М.О. Кравченко. 2016. «Особливості геміклональної популяційної системи зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) Корякового яру (НПП 'Гомільшанські ліси')». В *Матеріали Наукової Конференції 'Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку'*, 88–92. Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
46. Струс, В.О. 2019. «Морфометричне, фенетичне та генетичне різноманіття зелених жаб (*Pelophylax*) з різних популяційних систем». Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна.
47. Сурядна, Н.М., і Г.І. Микитинець. 2008. «Попередні дані з розповсюдження таксону гібридогенного походження *Pelophylax esculentus* на півдні України». *Праці Українського герпетологічного товариства*, вип. 1: 99–104.
48. Темников, А.В., А.О. Вегерина, Е.В. Мелешко, і О.В. Михайлова. 2012. «Исследование пloidности и размеров эритроцитов у неполовозрелых представителей *Pelophylax esculentus* complex». В *Мат. VII Міжнар. конф. мол. науковців*, 276–277. Харків.
49. Ткаченко, О.В. 2004. «Стан вивченості водної стадії онтогенезу земноводних фауни України». В *Природничі науки на межі століть: Матеріали науково-природничої конференції. (Ніжин, 23-25 березня 2004 р.)*, 90–91. Ніжин.
50. Фомичева, А.Ю., і Д.И. Лобойко. 2017. «Исследование состава геміклональной популяционной системы зеленых лягушек Корякова яра (Змиевской район Харьковской области)». В *Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference «Biology: From a Molecule up to the Biosphere»*, 149–150. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.
51. Хлус, Л.М., і І.В. Скільський. 2006. «Тваринний світ». В *Ландшафти міста Чернівці*, 168. Чернівці: Рута.

52. Черепашук, И.В., Е.П. Кочнева, С.С. Лаврикова, В.Д. Левчук, В.О. Мищерикова, Е.В. Мелешко, В.Д. Петлюк, Е.А. Продченко, А.И. Смирнова, і Р.О. Стоянов. 2015. «Исследование структуры популяционной системы зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) Иськовского пруда Змиевского района Харьковской области». В «*Biology: From A Molecule Up To The Biosphere*». Abstracts of the X International young scientists' conference, 185–86. Kharkiv: FLP Shapovalova T. N.
53. Шабанов, Д.А. 2015. «Еволюційна екологія популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) лівобережного Лісостепу України». Автореферат дисертації на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук, Дніпропетровськ: Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара.
54. Шабанов, Д.А., О.В. Бірюк, О.В. Коршунов, і М.О. Кравченко. 2017. «Поширення різних типів геміклональних популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) у басейні Сіверського Дінця». В *Матеріали науково-практичної конференції з нагоди 20-річчя створення національного природного парку «Святі Гори» Сучасний стан та охорона природних комплексів в басейні Сіверського Дінця*, 5:141–44. Conservation Biology in Ukraine. Святогірськ.
55. Шерстюк, Д.Д., И.В. Адонкина, А.А. Винюкова, Э.С. Пустовалова, і А.С. Шевченко. 2016. «Определение пloidности головастиков зеленых лягушек Нижнего Добрицкого пруда (НПП 'Гомольшанские леса')». В «*Biology: From A Molecule Up To The Biosphere*». Abstracts of the XI International young scientists' conference, 152–53. Kharkiv: V. N. Karazin KhNU.
56. Щербак, Н.Н., ред. 1989. *Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся*. Киев.
57. Щербак, Н.Н., і М.И. Щербань. 1980. *Земноводные и пресмыкающиеся Украинских Карпат*. Наукова Думка.

58. Abt, Gaby, i Heinz-Ulrich Reyer. 1993. «Mate Choice and Fitness in a Hybrid Frog: *Rana Esculenta* Females Prefer *Rana Lessonae* Males over Their Own». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32 (4): 221-228.
<https://doi.org/10.1007/BF00166511>.
59. Abt Tietje, Gaby, i Heinz-Ulrich Reyer. 2004. «Larval Development and Recruitment of Juveniles in a Natural Population of *Rana Lessonae* and *Rana Esculenta*». Edited by S. F. Fox. *Copeia* 2004 (3): 638–46.
<https://doi.org/10.1643/CE-03-273R1>.
60. Agapow, Paul-Michael, i Austin Burt. 2001. «Indices of Multilocus Linkage Disequilibrium». *Molecular Ecology Notes* 1 (1–2): 101–2.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>.
61. Alam, Mohammad Shafiqul, Mohammed Mafizul Islam, Md. Mukhlesur Rahman Khan, Mahmudul Hasan, Ratanasate Wanichanon, i Masayuki Sumida. 2012. «Postmating Isolation in Six Species of Three Genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from Family Dicroglossidae (Anura), with Special Reference to Spontaneous Production of Allotriploids». *Zoological Science* 29 (11): 743–52. <https://doi.org/10.2108/zsj.29.743>.
62. Altig, Ronald. 2007. «A Primer For The Morphology Of Anuran Tadpoles». *Herpetological Conservation and Biology* 2 (1): 71–74.
63. Altig, Ronald, i Roy W. McDiarmid. 2015. *Handbook of Larval Amphibians of the United States and Canada*. Ithaca ; London: Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press.
64. Altwegg, Res, i Heinz-Ulrich Reyer. 2003. «Patterns Of Natural Selection On Size At Metamorphosis In Water Frogs». *Evolution* 57 (4): 872–82.
65. Amanat Behbahani, M., M. M. Nokhbatolfoghahai, i H. R. Esmaili. 2014. «Intra-Specific Variation in *Pelophylax ridibunda* (*Rana ridibunda*) in Southern Iran: Life History and Developmental Patterns». *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 10 (1): 11–28.

66. Arifulova, I.I., i M.A. Chirikova. 2018. «Morphological Variability of Larval Mouthparts of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura, Ranidae) in Natural Populations of Southeastern Kazakhstan». *KnE Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/doi10.18502/cls.v4i3.2095>.
67. Arioli, Martina, Christian Jakob, i Heinz-Ulrich Reyer. 2010. «Genetic Diversity in Water Frog Hybrids (*Pelophylax esculentus*) Varies with Population Structure and Geographic Location». *Molecular Ecology* 19 (9): 1814–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04603.x>.
68. Avise, John C. 2015. «Evolutionary Perspectives on Clonal Reproduction in Vertebrate Animals». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (29): 8867–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501820112>.
69. Baker, John, Trevor Beebee, John Buckley, Tony Gent, i David Orchard. 2011. *Amphibian Habitat Management Handbook*. Bournemouth: Amphibian and Reptile Conservation.
70. Ballengée, Brandon, i Stanley K. Sessions. 2009. «Explanation for Missing Limbs in Deformed Amphibians». *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 312B (7): 770–79. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21296>.
71. Bannikov, A. G., i M. N. Denisova. 1956. *Ocherki po biologii zemnovodnych [In Russian]*. State learning-Pedagogical publishing of Ministry of education of RSSR. Moscow.
72. Berger, L. 1970. «Sex Ratio in the F1 Progeny within Forms of *Rana esculenta* Complex». *Genetica Polonica*, вип. 12: 87–101.
73. Berger, L. 1983. «Western Palearctic Water Frogs (Amphibia, Ranidae): Systematics, Genetics and Population Compositions». *Experientia* 39 (2): 127–30. <https://doi.org/10.1007/BF01958859>.
74. Berger, L., Th. Uzzell, i H. Hotz. 1982. «Crossing Experiments between Some Western Palearctic Species of Water Frogs (Salientia: Ranidae)». *Vertebrata Hungarica* XXI: 33–45.

75. Berger, Leszek. 1968. «Morphology of the F1 generation of various crosses within *Rana esculenta*-complex». *Zakład Zoologii Systematycznej Polskiej Akademii Nauk*.
76. Berger, Leszek. 1973. «Some characteristics of backcrosses within forms of *Rana esculenta* complex». *Genetica Polonica* 14 (4): 413–30.
77. Berger, Leszek. 1988. «Principles of studies of european water frogs» 31 (21): 563–80.
78. Berger, Leszek. 2008. *European green frogs and their protection*. Poznan: Fundacja Biblioteka Ekologiczna, PRODRUK.
79. Berger, Leszek, i Andrew W. Berger. 1992. «Progeny of water frog populations in central Poland». *Amphibia-Reptilia* 13: 135–46.
80. Berger, Leszek, Hansjürg Hotz, i Henryk Roguski. 1986. «Diploid Eggs of *Rana esculenta* with Two *Rana ridibunda* Genomes». *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 138 (1): 1–13.
81. Berger, Leszek, i Maria Ogielska. 1994. «Spontaneous haploid-triploid mosaicism in the progeny of a *Rana kl. esculenta* female and *Rana lessonae* males». *Amphibia-Reptilia* 15: 143–52.
82. Berger, Leszek, i Mariusz Rybacki. 1992. «Sperm competition of European water frogs». *Alytes* 10 (4): 113–16.
83. Berger, Leszek. 1994. «Sperm competition between two species of European water frogs (*Rana ridibunda* and *Rana lessonae*)». *Zoologica Poloniae* 39 (3–4): 281–91.
84. Berger, Leszek, Mariusz Rybacki, i Hansjürg Hotz. 1994. «Artificial fertilization of water frogs», вип. 15: 408–13.
85. Berger, Leszek, i Jan Smielowski. 1982. «Inheritance of Vertebral Stripe in *Rana ridibunda* Pall. (Amphibia, Ranidae)». *Amphibia-Reptilia* 3 (ЖОВТЕНЬ): 145–51.
86. Berger, Leszek, Thomas Uzzell, i Hansjurg Hotz. 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* 140 (1): 220–39.
87. Berset-Brändli, Laura, Julie Jaquiéry, Thomas Broquet, Yuko Ulrich, i Nicolas Perrin. 2008. «Extreme Heterochiasmy and Nascent Sex Chromosomes in European Tree Frogs». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275 (1642): 1577–85. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0298>.
88. Biliaiev, I., H. Bondarenko, D. Harbuz, M. Drohvalenko, Y. Siervatovska, U. Sudarenko, U. Teplenko, A. Fedorova, i D. Shabanov. 2018. «Composition and changes of three hemiclinal population systems of water frogs from NNP ‘Gomilshanski lisy’». В *Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій»*, 18–21. Шацьк: Львів : СПОЛОМ.
89. Biriuk, O., O. Usova, O. Meleshko, i D. Shabanov. 2016. «Stability of spermatogenesis and displays of natural selection at the cellular and individual level in immature representatives of the *Pelophylax esculentus* complex». *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology* 24 (1): 193–202. <https://doi.org/10.15421/011624>.
90. Biriuk, Olha V., Dmitriy A. Shabanov, Alexey V. Korshunov, Leo J. Borkin, Georgy A. Lada, Rosa A. Pasyukova, Jury M. Rosanov, i Spartak N. Litvinchuk. 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): 215–25. <https://doi.org/10.1111/jzs.12132>.
91. Bobrova, A.A., R.M. Makaryan, V.P. Sheiko, i D.A. Shabanov. 2014. «Impaired fertility in interspecific hybrids of green frogs from Seversko-Donetskiy center of *Pelophylax esculentus* complex diversity (in Ukrainian)». *Біологія та валеологія*, вип. 16 (Січень): 7–15.

92. Bogdan, Horia-Vlad, Severus-Daniel Covaciu-Marcov, Cornel Antal, Alfred-Ştefan Cicort-Lucaciu, i Istvan Sas. 2011. «New Cases of Winter-Active Amphibians in the Thermal Waters of Banat, Romania». *Archives of Biological Sciences* 63 (4): 1219–24. <https://doi.org/10.2298/ABS1104219B>.
93. Bondareva, A.A., Yu.S. Bibik, S.M. Samilo, i D.A. Shabanov. 2012. «Erythrocytes cytogenetic characteristics of green frogs from Siversky Donets centre of *Pelophylax esculentus* complex diversity». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 15 (1008): 116–23.
94. Bondareva, A.A., K.V. Sedova, i D. A. Shabanov. 2013. «The comparison of several hematological parameters of diploid and triploid *Pelophylax esculentus*». *Праці українського герпетологічного товариства* 4: 22–26.
95. Borkin, L. J., L. Berger, i R. Gunther. 1981. «On giant tadpoles of the green frogs of the *Rana esculenta* complex». *Proceedings of the Zoological institute, The Fauna and Ecology of Amphibians and Reptiles of the Palaeartic Asia*, 101: 29–47.
96. Borkin, Leo J, Alexey V Korshunov, Georgiy A Lada, Spartak N Litvinchuk, Jury M Rosanov, Dmitry A Shabanov, i Alexander I Zinenko. 2004. «Mass Occurrence of Polyploid Green Frogs (*Rana esculenta* Complex) in Eastern Ukraine». *Russian Journal of Herpetology* 11 (3): 194–213.
97. Bragg, Arthur N. 1936. «Notes on the Breeding Habits, Eggs, and Embryos of *Bufo Cognatus* with a Description of the Tadpole». *Copeia* 1936 (1): 14–20. <https://doi.org/10.2307/1436368>.
98. Brown, Donald D., i Liquan Cai. 2007. «Amphibian Metamorphosis». *Developmental Biology* 306 (1): 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>.
99. Browne, Robert K, Jessica Seratt, Carrie Vance, i Andrew Kouba. 2006. «Hormonal Priming, Induction of Ovulation and in-Vitro Fertilization of the Endangered Wyoming Toad (*Bufo baxteri*)». *Reproductive Biology and Endocrinology* 4 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-34>.

100. Bulut, Zafer, Cory R. McCormick, David Gopurenko, Rod N. Williams, David H. Bos, i J. Andrew DeWoody. 2009. «Microsatellite Mutation Rates in the Eastern Tiger Salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) Differ 10-Fold across Loci». *Genetica* 136 (3): 501–4. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9341-z>.
101. Burraco, Pablo, Jean-Marc Bonzom, Clément Car, Karine Beaugelin-Seiller, Sergey Gashchak, i Germán Orizaola. 2021. «Lack of Impact of Radiation on Blood Physiology Biomarkers of Chernobyl Tree Frogs». *Frontiers in Zoology* 18 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00416-x>.
102. Burraco, Pablo, Clément Car, Jean-Marc Bonzom, i Germán Orizaola. 2021. «Assessment of Exposure to Ionizing Radiation in Chernobyl Tree Frogs (*Hyla orientalis*)». *Scientific Reports* 11 (1): 20509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00125-9>.
103. Burraco, Pablo, i Germán Orizaola. 2022. «Ionizing Radiation and Melanism in Chornobyl Tree Frogs». *Evolutionary Applications* 15 (9): 1469–79. <https://doi.org/10.1111/eva.13476>.
104. Cambar, R., i Br. Marrot. 1954. «Table chronologique du développement de la grenouille agile (*Rana dalmatina* Bon.)». *Bull Biol*, вип. 88: 168–77.
105. Car, Clément, André Gilles, Olivier Armant, Pablo Burraco, Karine Beaugelin-Seiller, Sergey Gashchak, Virginie Camilleri, et al. 2022. «Unusual Evolution of Tree Frog Populations in the Chernobyl Exclusion Zone». *Evolutionary Applications* 00 (Січень): 1–17. <https://doi.org/10.1111/eva.13282>.
106. Carey, Cynthia, i Michael A. Alexander. 2003. «Climate Change and Amphibian Declines: Is There a Link?» *Diversity and Distributions* 9 (2): 111–21. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00011.x>.
107. Cassidy, Donna M., i Antonie W. Blackler. 1980. «Induction of Triploidy in *Xenopus laevis* by Heat Shocking of the Egg before and after

- Fertilization». *Journal of Experimental Zoology* 211 (3): 379–85.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402110315>.
108. Caughley, Graem. 1977. *Analysis of Vertebrate Populations*. London New York Sydney Toronto: John Wiley & Sons, Inc.
109. Chmielewska, Magdalena, Dmitry Dedukh, Katarzyna Haczekiewicz, Beata Rozenblut-Kościsty, Mikołaj Kaźmierczak, Krzysztof Kolenda, Ewa Serwa, Agnieszka Pietras-Lebioda, Alla Krasikova, i Maria Ogielska. 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26168-z>.
110. Chmielewska, Magdalena, Mikołaj Kaźmierczak, Beata Rozenblut-Kościsty, Krzysztof Kolenda, Anna Dudzik, Dmitrij Dedukh, i Maria Ogielska. 2022. «Genome Elimination from the Germline Cells in Diploid and Triploid Male Water Frogs *Pelophylax esculentus*». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (ЖОВТЕНЬ): 1008506.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1008506>.
111. Christiansen, D G, i H-U Reyer. 2011. «Effects of Geographic Distance, Sea Barriers and Habitat on the Genetic Structure and Diversity of All-Hybrid Water Frog Populations». *Heredity* 106 (1): 25–36.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2010.37>.
112. Christiansen, Ditte G. 2005. «Microsatellite-Based Method for Genotyping Diploid and Triploid Water Frogs of the *Rana esculenta* Hybrid Complex». *Molecular Ecology Notes* 5: 190–93. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1471-8286.2005.00869.x>.
113. Christiansen, Ditte G. 2009. «Gamete Types, Sex Determination and Stable Equilibria of All-Hybrid Populations of Diploid and Triploid Edible Frogs (*Pelophylax esculentus*)». *BMC Evolutionary Biology* 9 (1): 135.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-135>.

114. Christiansen, Ditte G, Christian Jakob, Martina Arioli, Sandra Roethlisberger, i Heinz-Ulrich Reyer. 2010. «Coexistence of Diploid and Triploid Hybrid Water Frogs: Population Differences Persist in the Apparent Absence of Differential Survival». *BMC Ecology* 10 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-10-14>.
115. Christiansen, Ditte G., i Heinz-Ulrich Reyer. 2009. «From Clonal to Sexual Hybrids: Genetic Recombination via Triploids in All-Hybrids Populations of Water Frogs». *Evolution* 63 (7): 1754–68. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00673.x>.
116. Covaciu-Marcov, Severus-Daniel, Ioan Ghira, Anca Ardeleanu, i Dan Cogalniceanu. 2003. «Studies on the influence of thermal water from Western Romania upon Amphibians». *Biota* 4 (1–2): 9–20.
117. Dawley, R. M., i J. P. Bogart, ред. 1989. *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. New York State Museum Shop.
118. Dedukh, D., S. Riumin, M. Chmielewska, B. Rozenblut-Kościsty, K. Kolenda, M. Kazmierczak, A. Dudzik, M. Ogielska, i A. Krasikova. 2020. «Micronuclei in Germ Cells of Hybrid Frogs from *Pelophylax esculentus* Complex Contain Gradually Eliminated Chromosomes». *Scientific Reports* 10 (8720): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64977-3>.
119. Dedukh, Dmitriy, i Alla Krasikova. 2021. «Delete and Survive: Strategies of Programmed Genetic Material Elimination in Eukaryotes». *Biological Reviews*, Вересень, 1–22. <https://doi.org/10.1111/brv.12796>.
120. Dedukh, Dmitriy, Julia Litvinchuk, Anton Svinin, Spartak Litvinchuk, Juriy Rosanov, i Alla Krasikova. 2019. «Variation in Hybridogenetic Hybrid Emergence between Populations of Water Frogs from the *Pelophylax esculentus* Complex». Edited by Pawel Michalak. *PLOS ONE* 14 (11): e0224759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224759>.
121. Dedukh, Dmitriy, Sergey Riumin, Krzysztof Kolenda, Magdalena Chmielewska, Beata Rozenblut-Kościsty, Mikołaj Kaźmierczak, Maria

- Ogielska, i Alla Krasikova. 2022. «Maintenance of Pure Hybridogenetic Water Frog Populations: Genotypic Variability in Progeny of Diploid and Triploid Parents». Edited by Igor V. Sharakhov. *PLOS ONE* 17 (7): e0268574.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268574>.
122. Dedukh, Dmitry, Spartak Litvinchuk, Juriy Rosanov, Glib Mazepa, Alsu Saifitdinova, Dmitry Shabanov, i Alla Krasikova. 2015. «Optional Endoreplication and Selective Elimination of Parental Genomes during Oogenesis in Diploid and Triploid Hybrid European Water Frogs». Edited by Pawel Michalak. *PLOS ONE* 10 (4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123304>.
123. Dedukh, Dmitry, Spartak Litvinchuk, Juriy Rosanov, Dmitry Shabanov, i Alla Krasikova. 2017. «Mutual Maintenance of Di- and Triploid *Pelophylax esculentus* Hybrids in R-E Systems: Results from Artificial Crossings Experiments». *BMC Evolutionary Biology* 17 (Грудень): 220.
<https://doi.org/10.1186/s12862-017-1063-3>.
124. Dedukh, D.V., i A.V. Krasikova. 2017. «Methodological Approaches for Studying the European Water Frog *Pelophylax esculentus* Complex». *Russian Journal of Genetics* 53 (8): 843–50.
<https://doi.org/10.1134/S102279541708004X>.
125. Denver, Robert J., Nooshan Mirhadi, i Marnie Phillips. 1998. «Adaptive Plasticity in Amphibian Metamorphosis: Response of *Scaphiopus hammondi* Tadpoles to Habitat Desiccation». *Ecology* 79 (6): 1859–72.
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1859:APIAMR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1859:APIAMR]2.0.CO;2).
126. Denver, Robert John. 1997. «Proximate Mechanisms of Phenotypic Plasticity in Amphibian Metamorphosis». *American Zoologist* 37 (2): 172–84.
<https://doi.org/10.1093/icb/37.2.172>.
127. Dettlaff, T., i S. Vassetzky. 1991. *Animal Species for Developmental Studies*. Вып. 2. Vertebrates. New York: Consultants Bureau.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3654-3>.

128. Dodd, C. Kenneth, ред. 2010. *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Techniques in Ecology and Conservation Series. Oxford ; New York: Oxford University Press.
129. Doležálková, Marie, Alexandr Sember, František Marec, Petr Ráb, Jörg Plötner, i Lukáš Choleva. 2016. «Is Premeiotic Genome Elimination an Exclusive Mechanism for Hemiclonal Reproduction in Hybrid Males of the Genus *Pelophylax*?» *BMC Genetics* 17 (Грудень): 100. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0408-z>.
130. Doležálková-Kaštánková, Marie, Glib Mazepa, Daniel L. Jeffries, Nicolas Perrin, Marcela Plötner, Jörg Plötner, Gaston-Denis Guex, et al. 2021. «Capture and Return of Sexual Genomes by Hybridogenetic Frogs Provide Clonal Genome Enrichment in a Sexual Species». *Scientific Reports* 11 (1): 1633. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81240-5>.
131. Doležálková-Kaštánková, Marie, Petr Pyszko, i Lukáš Choleva. 2022. «Early Development Survival of *Pelophylax* Water Frog Progeny Is Primarily Affected by Paternal Genomic Input». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 27 (8): 233. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2708233>.
132. Drohvalenko, M O. 2021. «Tadpole Morphology Features of Different *Pelophylax esculentus* Complex Forms». *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University, Biology*, , вип. 37: 51–64. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-4>.
133. Drohvalenko, M, E Pustovalova, i A Fedorova. 2019. «*Pelophylax esculentus* complex from Iskiv pond: One more step of long-term monitoring». В *Матеріали міжнародної зоологічної конференції «Фауна України на межі XX-XXI ст. Стан і біорізноманіття екосистем природоохоронних територій»*, 8–10. Львів, Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
134. Drohvalenko, M., E. Pustovalova, i A. Fedorova. 2021. «First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh River

- basin (Kharkiv region, Ukraine)». *Biodiversity, ecology and experimental biology* 23 (2): 61–67. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>.
135. Drohvalenko, M.O., A.O. Fedorova, E.S. Pustovalova, i P. Mikulíček. 2023. «Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclonal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex». В *Матеріалі Шостої Міжнародної Науково-Практичної Конференції «Регіональні Аспекти Флористичних І Фауністичних Досліджень»*. смт Путила. (in print)
136. Drohvalenko, M.O., R.M. Makaryan, O.V. Biriuk, A. V. Korshunov, i D. A. Shabanov. 2017. «The paradox of the reproduction of triploid *Pelophylax esculentus* in the hemiclonal population systems in Brusivka (Donetsk region) and Kreminna (Lugansk region)». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 29: 142–50.
137. Drohvalenko, Mykola. 2021. «Extended Breeding of the Marsh Frog, *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771)». *REPTILES & AMPHIBIANS* 28 (1): 37–39. <https://doi.org/doi.org/10.17161/randa.v28i1.15301>.
138. Drohvalenko, Mykola, i Anna Fedorova. 2022. «The First Evidence of Triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone». *Bonn Zoological Bulletin* 71 (2): 105–8. <https://doi.org/10.20363/BZB-2022.71.2.105>.
139. Drohvalenko, Mykola, Anna Fedorova, i Eleonora Pustovalova. 2022. «Unexpected Heterochrony in Edible Frog (*Pelophylax esculentus* Linnaeus 1758) and Pallas' Spadefoot (*Pelobates vespertinus* Pallas 1771) in Eastern Ukraine». *Reptiles & Amphibians* 29 (1): 472–74. <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>.
140. Dubey, Sylvain, Tiziano Maddalena, Laura Bonny, Daniel L. Jeffries, i Christophe Dufresnes. 2019. «Population Genomics of an Exceptional Hybridogenetic System of *Pelophylax* Water Frogs». *BMC Evolutionary Biology* 19 (Грудень): 164. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1482-4>.

141. Dubois, Alain. 2021. «Just metamorphosed amphibians: imagos or metamorphs?» *Bionomina* 25 (1): 1–20.
<https://doi.org/10.11646/BIONOMINA.25.1.1>.
142. Duellman, W.E., i L. Tueb. 1986. *Biology of Amphibians*. New York, USA: McGraw-Hill Inc., New York.
143. Duellman, William E., i Neil Schlager, ред. 2003. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 2nd edition. Вип. Volume 6. Amphibians. Farmington Hills, MI: Gale Group.
144. Dufresne, France, Marc Stift, Roland Vergilino, i Barbara K. Mable. 2014. «Recent Progress and Challenges in Population Genetics of Polyploid Organisms: An Overview of Current State-of-the-Art Molecular and Statistical Tools». *Molecular Ecology* 23 (1): 40–69. <https://doi.org/10.1111/mec.12581>.
145. Dufresnes, Christophe, Mathieu Denoël, Lionel di Santo, i Sylvain Dubey. 2017. «Multiple Uprising Invasions of *Pelophylax* Water Frogs, Potentially Inducing a New Hybridogenetic Complex». *Scientific Reports* 7 (1): 6506. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06655-5>.
146. Dufresnes, Christophe, i Sylvain Dubey. 2020. «Invasion Genomics Supports an Old Hybrid Swarm of Pool Frogs in Western Europe». *Biological Invasions* 22 (2): 205–10. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02112-8>.
147. Dufresnes, Christophe, i Glib Mazepa. 2020. «Hybridogenesis in Water Frogs». В *eLS*, edited by John Wiley & Sons, Ltd, 1:718–26. Wiley. <https://doi.org/10.1002/047001590X>.
148. Dufresnes, Christophe, Ilias Strachinis, Nataliia Suriadna, Galyna Mykytynets, Dan Cogălniceanu, Paul Székely, Tanja Vukov, et al. 2019. «Phylogeography of a Cryptic Speciation Continuum in Eurasian Spadefoot Toads (*Pelobates*)». *Molecular Ecology* 28 (13): 3257–70.
<https://doi.org/10.1111/mec.15133>.
149. Dufresnes, Christophe, Ilias Strachinis, Elias Tzoras, Spartak N. Litvinchuk, i Mathieu Denoël. 2019. «Call a Spade a Spade: Taxonomy and

- Distribution of *Pelobates*, with Description of a New Balkan Endemic». *ZooKeys* 859 (Липень): 131–58. <https://doi.org/10.3897/zookeys.859.33634>.
150. Eakin, Richard M. 1947. «Stages in the normal development of *Hyla regilla*». *University of California Publications in Zoology*, вип. 51: 245–57.
151. Eggert, Christophe. 2004. «Sex Determination: The Amphibian Models». *Reproduction Nutrition Development* 44 (6): 539–49. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004062>.
152. Fabrezi, M., S. I. Quinzio, i J. Goldberg. 2009. «Giant Tadpole and Delayed Metamorphosis of *Pseudis platensis* Gallardo, 1961 (Anura, Hylidae)». *Journal of Herpetology* 43 (2): 228–43. <https://doi.org/10.1670/08-028R3.1>.
153. Fabrezi, Marissa. 2011. «Heterochrony in Growth and Development in Anurans from the Chaco of South America». *Evolutionary Biology* 38 (4): 390–411. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9128-5>.
154. Fabrezi, Marissa, Silvia I. Quinzio, i Javier Goldberg. 2010. «The Ontogeny of *Pseudis platensis* (Anura, Hylidae): Heterochrony and the Effects of Larval Development on Postmetamorphic Life». *Journal of Morphology* 271: 496–510. <https://doi.org/10.1002/jmor.10815>.
155. Fedorova, A., i D. Shabanov. 2022. «Genomes Diversity in Oocytes of Hybrid Water Frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Hemiclonal Populaiton Systems from Ukraine». *Biodiversity, Ecology and Experimental Biology* 24 (1): 25–29. <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.24.1.03>.
156. Fedorova, Anna, i Eleonora Pustovalova. 2019. «Results of artificial crossings expand data about reproduction and composition of unusual population system (*Pelophylax esculentus* complex)». В *Abstract Book of 62nd International Conference For Students Of Physics And Natural Sciences Open Readings*, 460. Vilnius, Lithuania.
157. Fedorova, Anna, Eleonora Pustovalova, i Mykola Drohvalenko. 2023. «High Frequency of Hindlimb Malformation in Froglets *Pelophylax sp.* in

- Ukraine». *The Herpetological Bulletin*, вип. 164 (Червень): 24–25.
<https://doi.org/10.33256/hb164.2425>.
158. Fedorova, Anna, Eleonora Pustovalova, Irina Leliukh, Katerina Klymenko, i Anastasiia Polishchuk. 2019. «Hemiclonal population system of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from Koryakiv yar pond: results of annual monitoring». В *Abstracts of the XIV International Young Scientists' Conference Biology: From A Molecule Up To The Biosphere*, 172–74. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.
159. Fedorova, Anna, i Dmytro Shabanov. 2022. «Differences in Release Calls of the Hybrid Water Frog *Pelophylax esculentus* and Its Parental Species *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) in Ukraine». *Biologia*, Листопад.
<https://doi.org/10.1007/s11756-022-01256-8>.
160. Fedorova, A.O., M.O. Drohvalenko, i E.S. Pustovalova. 2018. «Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond». В *Abstract book of the*, 12:22–23. Kiev, Institute of zoology: Zoological courier. <http://izan.kiev.ua/rmd/KMDZ18-abstr.pdf>.
161. Fomenko, K.S., R.R. Trokhymchuk, R.R. Lukan, R.N. Makaryan, i E.S. Pustovalova. 2017. «The study of hemiclonal population system *Pelophylax esculentus* complex from the Lower Dobritskiy pond (the territory of the National Park “Gomolshanski lisy”)». В *Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference «Biology: From A Molecule Up To The Biosphere»*, 152–53. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.
162. Fominykh, A. S., i S. M. Lyapkov. 2012. «The Formation of New Characteristics in the Life Cycle of the Marsh Frog (*Rana ridibunda*) in Thermal Ponds». *Biology Bulletin Reviews* 2 (3): 211–25.
<https://doi.org/10.1134/S2079086412030036>.
163. Forzán, María J., Raphaël V. Vanderstichel, Christopher T. Ogbuah, John R. Barta, i Todd G. Smith. 2012. «Blood Collection from the Facial (Maxillary)/Musculo-Cutaneous Vein in True Frogs (Family Ranidae)».

- Journal of Wildlife Diseases* 48 (1): 176–80. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.176>.
164. Fox, Harold. 1984. *Amphibian Morphogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press.
165. Garner, T. W. J., B. Gautschi, S. Röthlisberger, i H.-U. Reyer. 2000. «A Set of CA Repeat Microsatellite Markers Derived from the Pool Frog, *Rana lessonae*». *Molecular Ecology* 9 (12): 2173–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.105311.x>.
166. Gashchak, S. P., Yu. A. Maklyuk, A. M. Maksimenko, i M. D. Bondarkov. 2009. «Radioecology of amphibians of Exclusion zone». *Problems of Chernobyl Exclusion zone*, 2009.
167. Godome, Théophile, Sèlomè Wilfried Sintondji, Mahunan Tobias Césaire Azon, Comlan Ephrem Tossavi, Nahoua Issa Ouattara, i Emile Didier Fiogbe. 2021. «Artificial Reproduction and Embryogeny of the Tiger Frog *Hoplobatrachus occipitalis* (Günther 1858)». *Proceedings of the Zoological Society* 74 (1): 43–51. <https://doi.org/10.1007/s12595-020-00341-7>.
168. Gosner, Kenneth L. 1960. «A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification». *Herpetologica* 16(3): 183-90.
169. Gosner, Kenneth L., i Irving H. Black. 1954. «Larval Development in *Bufo woodhousei fowleri* and *Scaphiopus holbrooki holbrooki*». *Copeia* 1954 (4): 251–55. <https://doi.org/10.2307/1440034>.
170. Guex', Gaston-Denis, Hansjiirg Hotz', Thomas Uzzel, Raymond D Semlitsch, Peter Beerlid, i Rita Pascolinis. 2001. «Developmental Disturbances in *Rana esculenta* Tadpoles and Metamorphs». *Zoosystematics and Evolution* 77 (1): 79–86.
171. Guex, Gaston-Denis, Hansjurg Hotz, i Raymond D. Semlitsch. 2002. «Deleterious Alleles And Differential Viability in Progeny of Natural

- Hemiclonal Frogs». *Evolution* 56 (5): 1036–44. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01414.x>.
172. Gunther, R., T. Uzzell, i L. Berger. 1979. «Inheritance patterns in triploid *Rana* ‘*esculenta*’ (Amphibia, Salientia)». *Mitteilungen aus dem zoologischen Museum in Berlin* 55 (1): 35–57.
173. Günther, Rainer. 1978. «Zur Larvenmorphologie von *Rana ridibunda* Pall., *R. lessonae* Cam. und Deren Bastard *R. “esculenta”* L. (Anura, Ranidae)». *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologisches Museum und Institut für Spezielle Zoologie (Berlin)* 54 (1): 161–79. <https://doi.org/10.1002/mmnz.19780540107>.
174. Haas, A., i I. Das. 2011. «Describing East Malaysian Tadpole Diversity: Status and Recommendations for Standards and Procedures Associated with Larval Amphibian Description and Documentation». *Bonner Zoologische Monographien* 57: 29–46.
175. Hall, T.A. 1999. «BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT». *Nucleic acids symposium series* 41 (41): 95–98.
176. Hasan, Mahmudul, Mohammed Mafizul Islam, Mukhlesur Rahman Khan, Ratanasate Wanichanon, Atsushi Kurabayashi, i Masayuki Sumida. 2017. «Reproductive Isolating Mechanisms in the Bangladesh Coastal Bullfrog *Hoplobatrachus litoralis* and Its Congeneric Species Revealed by Crossing Experiments and Examination on Spermatogenesis of the Hybrids». *Asian Herpetological Research* 8 (1): 27–38.
177. Hayes, Tyrone B. 1997a. «Amphibian Metamorphosis: An Integrative Approach». *American Zoologist* 37 (2): 121–23. <https://doi.org/10.1093/icb/37.2.121>.
178. Hayes, Tyrone B. 1997b. «Steroids as Potential Modulators of Thyroid Hormone Activity in Anuran Metamorphosis». *American Zoologist* 37 (2): 185–94. <https://doi.org/10.1093/icb/37.2.185>.

179. Henle, Klaus, Alain Dubois, i Vladimir Vershinin. 2017. «A Review of Anomalies in Natural Populations of Amphibians and Their Potential Causes». *Mertensiella* 25: 57–164.
180. Heppich, S., H. G. Tunner, i J. Greilhuber. 1982. «Premeiotic Chromosome Doubling after Genome Elimination during Spermatogenesis of the Species Hybrid *Rana esculenta*». *Theoretical and Applied Genetics* 61 (2): 101–4. <https://doi.org/10.1007/BF00273874>.
181. Herczeg, Dávid, Judit Vörös, Ditte G. Christiansen, Michal Benovics, i Peter Mikulíček. 2017. «Taxonomic Composition and Ploidy Level among European Water Frogs (Anura: Ranidae: *Pelophylax*) in Eastern Hungary». *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 55 (2): 129–37. <https://doi.org/10.1111/jzs.12158>.
182. Hermaniuk, Adam, Magdalena Czajkowska, Anetta Borkowska, i Jan R.E. Taylor. 2020. «Body Size Variation in Hybrids among Populations of European Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex) with Different Breeding Systems». *Amphibia-Reptilia*, Березень, 1–11. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10005>.
183. Hermaniuk, Adam, Nicolas B. M. Pruvost, Piotr Kierzkowski, i Maria Ogielska. 2013. «Genetic and Cytogenetic Characteristics of Pentaploidy in Water Frogs». *Herpetologica* 69 (1): 36–45. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00037>.
184. Hermaniuk, Adam, Mariusz Rybacki, i Jan R. E. Taylor. 2016. «Low Temperature and Polyploidy Result in Larger Cell and Body Size in an Ectothermic Vertebrate». *Physiological and Biochemical Zoology* 89 (2): 118–29. <https://doi.org/10.1086/684974>.
185. Hilman, Stanley S., Philip C. Withers, Robert C. Drews, i Hillyard. 2009. *Ecological Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press.

186. Hoffmann, Alexandra, Gaby Abt Tietje, i Heinz-Ulrich Reyer. 2015. «Spatial Behavior in Relation to Mating Systems: Movement Patterns, Nearest-Neighbor Distances, and Mating Success in Diploid and Polyploid Frog Hybrids (*Pelophylax esculentus*)». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69 (3): 501–17. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1862-0>.
187. Hoffmann, Alexandra, Jörg Plötner, Nicolas B. M. Pruvost, Ditte G. Christiansen, Sandra Röthlisberger, Lukáš Choleva, Peter Mikulíček, et al. 2015. «Genetic Diversity and Distribution Patterns of Diploid and Polyploid Hybrid Water Frog Populations (*Pelophylax esculentus* Complex) across Europe». *Molecular Ecology* 24 (17): 4371–91. <https://doi.org/10.1111/mec.13325>.
188. Hoffmann, Alexandra, i Heinz-Ulrich Reyer. 2013. «Genomic Effects on Advertisement Call Structure in Diploid and Triploid Hybrid Waterfrogs (*Anura, Pelophylax esculentus*)». *BMC Ecology* 13 (1): 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-47>.
189. Holenweg, A. -K., i H. -U. Reyer. 2000. «Hibernation Behavior of *Rana lessonae* and *R. esculenta* in Their Natural Habitat». *Oecologia* 123 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1007/s004420050987>.
190. Holsbeek, G., i R. Jooris. 2010. «Potential Impact of Genome Exclusion by Alien Species in the Hybridogenetic Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex)». *Biological Invasions* 12 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9427-2>.
191. Holt, William V., Janine L. Brown, i Pierre Comizzoli, ред. 2014. *Reproductive Sciences in Animal Conservation. Progress and Prospects*. Springer.
192. Hotz, Hansjürg, Raymond D. Semlitsch, Eva Gutmann, Gaston-Denis Guex, i Peter Beerli. 1999. «Spontaneous Heterosis in Larval Life-History Traits of Hemiclonal Frog Hybrids». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5): 2171–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2171>.

193. Hotz, Hansjürg, Thomas Uzzell, Gaston-Denis Guex, Deryn Alpers, Raymond D. Semlitsch, i Peter Beerli. 2001. «Microsatellites: A Tool for Evolutionary Genetic Studies of Western Palearctic Water Frogs». *Zoosystematics and Evolution* 77 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1002/mmnz.20010770108>.
194. Hughes, A. Randall, Brian D. Inouye, Marc T. J. Johnson, Nora Underwood, i Mark Vellend. 2008. «Ecological Consequences of Genetic Diversity». *Ecology Letters* 11 (6): 609–23. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>.
195. Ilić, M. 2016. «Identification Of Syntopic Anuran Species In Early Tadpole Stages: Correspondence Between Morphometric And Genetic Data». *Applied Ecology and Environmental Research* 14 (2): 381–97. https://doi.org/10.15666/aeer/1402_381397.
196. Ilić, Marija, Vida Jojić, Gorana Stamenković, Vanja Marković, Vladica Simić, Momir Paunović, i Jelka Crnobrnja-Isailović. 2019. «Geometric vs. Traditional Morphometric Methods for Exploring Morphological Variation of Tadpoles at Early Developmental Stages». *Amphibia-Reptilia* 40 (4): 499–509. <https://doi.org/10.1163/15685381-00001193>.
197. Islam, Mohammed Mafizul, Naoko Kurose, MdMukhlesur Rahman Khan, Toshitaka Nishizawa, Mitsuru Kuramoto, Mohammad Shafiqul Alam, Mahmudul Hasan, Nia Kurniawan, Midori Nishioka, i Masayuki Sumida. 2008. «Genetic Divergence and Reproductive Isolation in the Genus *Fejervarya* (Amphibia: Anura) from Bangladesh Inferred from Morphological Observations, Crossing Experiments, and Molecular Analyses». *Zoological Science* 25 (11): 1084–1105. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.1084>.
198. Jakob, C, M Arioli, i H U Reyer. 2010. «Ploidy Composition in All-Hybrid Frog Populations in Relation to Ecological Conditions». *Evolutionary Ecology Research* 12: 633–52. <https://doi.org/10.5167/UZH-38402>.

199. Jakob, Christian. 2007. «Structure and Dynamics of Pure Hybridogenetic Water Frog Populations of *Rana esculenta* in Southern Sweden». Dissertation, Zurich: University of Zurich, Faculty of Science. Zurich Open Repository and Archive. <https://doi.org/10.5167/uzh-163640>.
200. Jakob, Christian, i Martina Arioli. 2007. «Occurrence and Survival of Offspring Genotypes in a Pure Hybrid Population of *Rana esculenta*: An Experimental Approach». B *Structure and Dynamics of Pure Hybridogenetic Water Frog Populations of Rana Esculenta in Southern Sweden*, 136–66. Zurich: University of Zurich, Faculty of Science. <https://doi.org/10.5167/uzh-163640>.
201. Jamieson, Barrie G. M., ред. 2003. *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. Reproductive Biology and Phylogeny, v. 2. Enfield, NH: Science Publishers.
202. Johnson, James B., Daniel Saenz, Cory K. Adams, i Toby J. Hibbitts. 2015. «Naturally Occurring Variation in Tadpole Morphology and Performance Linked to Predator Regime». *Ecology and Evolution* 5 (15): 2991–3002. <https://doi.org/10.1002/ece3.1538>.
203. Johnson, Pieter T. J., Kevin B. Lunde, Euan G. Ritchie, i Alan E. Launer. 1999. «The Effect of Trematode Infection on Amphibian Limb Development and Survivorship». *Science* 284 (5415): 802–4. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.802>.
204. Just, John J., Josef Schwager, Rudolf Weber, Hans Fey, i Hedi Pfister. 1980. «Immunological Analysis of Hemoglobin Transition during Metamorphosis of Normal and isogenic *Xenopus*». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 188 (1): 75–80. <https://doi.org/10.1007/BF00848612>.
205. Kawamura, Toshijiro, Midori Nishioka, i Hiroaki Ueda. 1980. «Intra- and Interspecific hybrids among Japanese, European and American Toads». *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol., Hiroshima Univ.*, 1980.

206. Kierzkowski, Piotr, Piotr Kosiba, Mariusz Rybacki, Małgorzata Socha, i Maria Ogielska. 2013. «Genome Dosage Effect and Colouration Features in Hybridogenetic Water Frogs of the *Pelophylax esculentus* Complex». *Amphibia-Reptilia* 34 (4): 493–504.
<https://doi.org/10.1163/15685381-00002904>.
207. Kierzkowski, Piotr, Łukasz Paśko, Mariusz Rybacki, Małgorzata Socha, i Maria Ogielska. 2011. «Genome Dosage Effect and Hybrid Morphology — The Case of the Hybridogenetic Water Frogs of the *Pelophylax esculentus* Complex». *Annales Zoologici Fennici* 48 (1): 56–66.
<https://doi.org/10.5735/086.048.0106>.
208. Kondo, Yasuyuki. 2002. «Developmental Capacity and Chromosome Number in the Offspring of Artificially Produced Autotetraploids of *Rana nigromaculata*». *Zoological Science* 19 (8): 877–83.
<https://doi.org/10.2108/zsj.19.877>.
209. Korshunov, A. V. 2008. «Ecological patterns of biotopic distribution of *Pelophylax esculentus* complex in Kharkiv region». *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University* 8 (828): 48–57.
210. Kouba, A.J., C.K. Vance, i E.L. Willis. 2009. «Artificial Fertilization for Amphibian Conservation: Current Knowledge and Future Considerations». *Theriogenology* 71 (1): 214–27.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.055>.
211. Kryvoltsevych, Anastasia, Anna Fedorova, Dmytro Shabanov, i Eleonora Pustovalova. 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): 204–9. <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.16446>.
212. Kuzmin, Yuriy, Ivanna Dmytrieva, Oleksiy Marushchak, Svyatoslav Morozov-Leonov, Oleksandra Oskyrko, i Oksana Nekrasova. 2020. «Helminth Species and Infracommunities in Frogs *Pelophylax ridibundus* and *P.*

- esculentus* (Amphibia: Ranidae) in Northern Ukraine». *Acta Parasitologica* 65 (2): 341–53. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00164-3>.
213. Lada, G. A., L.J. Borkin, S. N. Litvinchuk, i J. M. Rosanov. 2011. «Species Composition and Population Systems of Green Frogs, *Rana esculenta* complex (Amphibia; Anura) in the Psyol' River Drainage». *Праці Українського герпетологічного товариства* 3: 76–83.
214. Leuenberger, Julien, Antoine Gander, Benedikt R. Schmidt, i Nicolas Perrin. 2014. «Are Invasive Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) Replacing the Native *P. lessonae*/*P. esculentus* Hybridogenetic Complex in Western Europe? Genetic Evidence from a Field Study». *Conservation Genetics* 15 (4): 869–78. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0585-0>.
215. Limbaugh, Beverly A., i E. Peter Volpe. 1957. «Early Development of the Gulf Coast Toad, *Bufo valliceps* Wiegmann», вип. 1842.
216. Lipke, Christian, Sabine Meinecke-Tillmann, i Burkhard Meinecke. 2009. «Induced Spermiation and Sperm Morphology in a Dendrobatid Frog, *Dendrobates auratus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae)». *SALAMANDRA* 45 (2): 10.
217. Litvinchuk, Spartak N, Alexander Yu Ivanov, Svetlana A Lukonina, i Oleg A Ermakov. 2020. «A Record of Alien *Pelophylax* Species and Widespread Mitochondrial DNA Transfer in Kaliningradskaya Oblast' (the Baltic Coast, Russia)». *BioInvasions Records*, 19. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.3.16>.
218. Llorente, Gustavo, Albert Montori, i Alex Richter-Boix. 2006. «Breeding Phenology of an Amphibian Community in a Mediterranean Area». *Amphibia-Reptilia* 27 (4): 549–59. <https://doi.org/10.1163/156853806778877149>.
219. Macgregor, Herbert C., i Jennifer M. Varley. 1988. *Working with Animal Chromosomes*. Wiley.

220. Mazepa, G., M. Dolezalkova, L. Choleva, J. Ploetner, O. Biriuk, M. Drohvalenko, O. Korshunov, D. Shabanov, J. Wolf, i N. Perrin. 2018. «Distinct fate of the asexual genomes in two convergently evolved *Pelophylax* hybridogenetic systems». B *Sex Uncovered: The Evolutionary Biology Of Reproductive Systems*, 57. Roscoff (Brittany), France.
221. McCollum, S. A., i J. D. Leimberger. 1997. «Predator-Induced Morphological Changes in an Amphibian: Predation by Dragonflies Affects Tadpole Shape and Color». *Oecologia* 109 (4): 615–21. <https://doi.org/10.1007/s004420050124>.
222. McDiarmid, Roy W., i Ronald Altig. 1999. *Tadpoles. The biology of Anuran larvae*. Chicago, London: The University of Chicago Press.
223. Meleshko, E.V., i M.O. Kravchenko. 2012. «The research of state of the green frogs' population system (*Pelophylax esculentus* complex) of Is'kov pond in Zmievsky area of the Kharkov region», Біологія, , вип. XVII: 111–15.
224. Meleshko, O V, O V Korshunov, i D A Shabanov. 2014. «The Study of Three Hemiclonal Population Systems of *Pelophylax esculentus* Complex from the Seversko-Donetskiy Center of Green Frogs' Diversity». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 20 (1100): 153–58.
225. Meteyer, Carol U. 2000. «Field Guide to Malformations of Frogs and Toads: With Radiographic Interpretations». 2000–0005. *Biological Science Report*. U.S. Geological Survey. <https://pubs.usgs.gov/publication/53882>.
226. Michaels, Christopher J, i Kristofer Försäter. 2017. «Captive Breeding of *Pelophylax* Water Frogs under Controlled Conditions Indoors». *The Herpetological Bulletin* 142: 29–34.
227. Mikulíček, P., M. Kautman, B. Demovič, i K. Janko. 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: 628–42. <https://doi.org/doi: 10.1111/jeb.12332>.

228. Mikuliček, Peter, Matej Kautman, Ján Kautman, i Nicolas B. M. Pruvost. 2015. «Mode of Hybridogenesis and Habitat Preferences Influence Population Composition of Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex, Anura: Ranidae) in a Region of Sympatric Occurrence (Western Slovakia)». *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53 (2): 124–32. <https://doi.org/10.1111/jzs.12083>.
229. Mikuliček, Peter, i Petr Kotlik. 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)». *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin* 77 (1): 59–64.
230. Moss, B, i V M Ingram. 1965. «The Repression and Induction by Thyroxin of Hemoglobin Synthesis during Amphibian Metamorphosis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54 (3): 967–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.967>.
231. Muller, Hermann Joseph. 1964. «The relation of recombination to mutational advance». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1 (1): 2–9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(64\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8).
232. Nekrasova, O.D. 2008. «Classification of Amphibians Anomalies.» *Proceedings of the Ukrainian Herpetological Society*, вип. 1 (Січень): 55–58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4998.8009>.
233. Norris, David O., i Kristin H. Lopez. 2011. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Вип. 2. Amphibians. Elsevier.
234. Ogielska, Maria, ред. 2009. *Reproduction of Amphibians*. Science Publishers.
235. Ogielska, Maria, Piotr Kierzkowski, i Mariusz Rybacki. 2004. «DNA Content and Genome Composition of Diploid and Triploid Water Frogs Belonging to the *Rana esculenta* Complex (Amphibia, Anura)». *Canadian Journal of Zoology* 82 (12): 1894–1901. <https://doi.org/10.1139/z04-188>.

236. Orton, Grace L. 1946. «Larval development of the eastern narrow-mouthed frog, *Microhyla carolinensis* (Holbrook)». *Louisiana. Ann. Camegie Mus.*, вип. 30: 241–47.
237. Oulett, M. 2000. «Amphibian deformities: current state of knowledge». *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press. Pensacola, Florida.*, 617–61.
238. Pagano, A., T. Lode, i P.A. Crochet. 2001. «New Contact Zone and Assemblages among Water Frogs of Southern France». *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 39 (1–2): 63–67.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2001.00156.x>.
239. Parris, Matthew J. 2001. «High Larval Performance Of Leopard Frog Hybrids: Effects Of Environment-Dependent Selection». *Ecology* 82 (11): 3001–9. [https://doi.org/10.1890/0012-658\(2001\)082\[3001:HLPOLF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-658(2001)082[3001:HLPOLF]2.0.CO;2).
240. Peakall, R., i P.E. Smouse. 2012. «GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update». *Bioinformatics* 28: 2537–39.
241. Peakall, Rod, i Peter E. Smouse. 2006. «GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research». *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288–95. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
242. Pisanets, E. M. 2007. *Amfibii Ukrainy: spravochnik-opredelitel' zemnovodnykh Ukrainy i sopredel'nykh territoriï*. Kiev: Zoologicheskii muzeï Ukrainy NNPM NAN Ukrainy.
243. Plenet, Sandrine, Frederic Hervant, i Pierre Joly. 2000. «Ecology of the Hybridogenetic *Rana esculenta* Complex: Differential Oxygen Requirements of Tadpoles». *Evolutionary Ecology* 14 (Січень): 13–23.
<https://doi.org/10.1023/A:1011056703016>.

244. Plotner, Jorg. 2005. *Die westpalaarktischen Wasserfrosche: von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation*. Bielefeld: Laurenti.
245. Plötner, Jörg, Çiğdem Akın Pekşen, Felix Baier, Thomas Uzzell, i C. Can Bilgin. 2015. «Genetic Evidence for Human-Mediated Introduction of Anatolian Water Frogs (*Pelophylax cf. bedriagae*) to Cyprus (Amphibia: Ranidae)». *Zoology in the Middle East* 61 (2): 125–32.
<https://doi.org/10.1080/09397140.2015.1027495>.
246. Plotner, Jorg, Frank Kohler, Thomas Uzzell, i Peter Beerli. 2007. «Molecular Systematics of Amphibians». В *Amphibian Biology*, 7:2672–2756.
247. Plötner, Jörg, Thomas Uzzell, Peter Beerli, Çiğdem Akın, C. Can Bilgin, Cornelia Haefeli, Torsten Ohst, et al. 2010. «Genetic Divergence and Evolution of Reproductive Isolation in Eastern Mediterranean Water Frogs». В *Evolution in Action*, edited by Matthias Glaubrecht, 373–403. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12425-9_18.
248. Pollack, Emanuel D., i Helen M. Maheras-Rarick. 1990. «Differential Limb Regeneration in Diploid and Triploid *Rana pipiens* Larvae with Reference to Spinal Motor Neuron Development». *Journal of Experimental Zoology* 254 (3): 276–85. <https://doi.org/10.1002/jez.1402540306>.
249. Pollister, Arthur W., i John A. Moore. 1937. «Tables for the Normal Development of *Rana sylvatica*». *The Anatomical Record* 68 (4): 489–96.
<https://doi.org/10.1002/ar.1090680410>.
250. Polls Pelaz, M. 1994. «Modes of gametogenesis among kleptons of the hybridogenetic water frog complex: An evolutionary synthesis». *Zoologica Poloniae*, вип. 39: 3–4.
251. Poole, Vicky A., i Shelly Grow, ред. 2012. *Amphibian Husbandry Resource Guide.pdf*. 2.0. Silver Spring: Association of Zoos and Aquariums.
252. Pruvost, N. B. M., P. Mikulíček, L. Choleva, i H.-U. Reyer. 2015. «Contrasting Reproductive Strategies of Triploid Hybrid Males in Vertebrate

- Mating Systems». *Journal of Evolutionary Biology* 28 (Січень): 189–204.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12556>.
253. Pruvost, Nicolas B. M., Alexandra Hoffmann, i Heinz-Ulrich Reyer. 2013. «Gamete Production Patterns, Ploidy, and Population Genetics Reveal Evolutionary Significant Units in Hybrid Water Frogs (*Pelophylax esculentus*)». *Ecology and Evolution* 3 (9): 2933–46. <https://doi.org/10.1002/ece3.687>.
254. Pruvost, Nicolas B. M., Daniel Hollinger, i Heinz-Ulrich Reyer. 2013. «Genotype-Temperature Interactions on Larval Performance Shape Population Structure in Hybridogenetic Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex)». Edited by Robbie Wilson. *Functional Ecology* 27 (2): 459–71.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12049>.
255. Pustovalova, E., A. Fedorova, i M. Drohvalenko. 2021. «Exploring *Pelophylax esculentus* systems: first records of triploids in the Mozh river basin». В *Матеріали всеукраїнської наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій»*, 13–16. Львів, Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
256. Pustovalova, Eleonora, Lukaš Choleva, Dmytro Shabanov, i Dmitriy Dedukh. 2022. «The High Diversity of Gametogenic Pathways in Amphispermic Water Frog Hybrids from Eastern Ukraine». *PeerJ* 10 (Серпень): e13957. <https://doi.org/10.7717/peerj.13957>.
257. Pustovalova, Eleonora, Anna Fedorova, Ksenia Pereslavskaya, i Polina Verchoturova. 2019. «Hemiclonal population system of water frogs in Lower Dobrytskyi pond: results of annual monitoring». В *Abstracts of the XIV International Young Scientists' Conference Biology: From A Molecule Up To The Biosphere*, 185–86. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University.
258. Pustovalova, Eleonora, Anna Fedorova, i Dmytro Shabanov. 2022. «Methodology for Intravital Mitotic Chromosome Preparation from

- Regenerated Tissue Derived from the Tail Tips of Tadpoles». *Journal of Vertebrate Biology* 71 (2010).
259. Pysanets, Yevgen. 2014. *Amphibians of Eastern Europe. Part II. Order Ecaudata*. Kyiv: Zoological Museum NNPM NAS Ukraine.
260. R Core Team. 2022. «R: A Language and Environment for Statistical Computing». Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
261. Raghianti, Matilde, Francesca Guerrini, Stefania Bucci, Giorgio Mancino, Hansjürg Hotz, Thomas Uzzell, i Gaston-Denis Guex. 1995. «Molecular Characterization of a Centromeric Satellite DNA in the Hemiclonal Hybrid frog *Rana esculenta* and Its Parental Species». *Chromosome Research* 3 (8): 497–506. <https://doi.org/10.1007/BF00713965>.
262. Reyer, Heinz-Ulrich, Christian Arioli-Jakob, i Martina Arioli. 2015. «Post-Zygotic Selection against Parental Genotypes during Larval Development Maintains All-Hybrid Populations of the Frog *Pelophylax esculentus*». *BMC Evolutionary Biology* 15 (131): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0404-3>.
263. Reyer, Heinz-Ulrich, Bettina Niederer, i Attila Hettyey. 2003. «Variation in Fertilisation Abilities between Hemiclonal Hybrid and Sexual Parental Males of Sympatric Water Frogs (*Rana lessonae*, *R. esculenta*, *R. ridibunda*)». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54 (3): 274–84. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0635-y>.
264. Rodríguez-Rodríguez, Eduardo José, Juan Francisco Beltrán, i Rafael Márquez. 2020. «Melanophore Metachrosis Response in Amphibian Tadpoles: Effect of Background Colour, Light and Temperature». *Amphibia-Reptilia* 42 (1): 133–40. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10032>.
265. Roelants, Kim, Alexander Haas, i Franky Bossuyt. 2011. «Anuran Radiations and the Evolution of Tadpole Morphospace». *PNAS* 108 (21): 8731–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100633108>.

266. Rot-Nikcevic, Irena, i Richard J. Wassersug. 2003. «Tissue Sensitivity to Thyroid Hormone in Athyroid *Xenopus laevis* Larvae». *Development, Growth and Differentiation* 45 (4): 321–25. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.2003.00700.x>.
267. Rot-Nikcevic, Irena, i Richard J. Wassersug. 2004. «Arrested Development in *Xenopus laevis* Tadpoles: How Size Constrains Metamorphosis». *Journal of Experimental Biology* 207 (12): 2133–45. <https://doi.org/10.1242/jeb.01002>.
268. Rugh, Roberts. 1962. *Experimental Embryology. Techniques and Procedures*. 3ий вид. Minneapolis 15, Minnesota: Burgess Pub. Co. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6412>.
269. Sánchez-Montes, Gregorio, Ernesto Recuero, Jorge Gutiérrez-Rodríguez, Ivan Gomez-Mestre, i Iñigo Martínez-Solano. 2016. «Species Assignment in the *Pelophylax ridibundus* x *P. perezi* Hybridogenetic Complex Based on 16 Newly Characterised Microsatellite Markers». *Herpetological Journal* 26: 99–108.
270. Schempp, W., i M. Schmid. 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. <https://doi.org/10.1007/BF00328528>.
271. Schmid, Michael, Ben J. Evans, i James P. Bogart. 2015. «Polyploidy in Amphibia». *Cytogenetic and Genome Research* 145 (3–4): 315–30. <https://doi.org/10.1159/000431388>.
272. Schön, Isa, Koen Martens, i Peter Dijk, ред. 2009. *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2770-2>.
273. Semlitsch, R. D. 1991. «Performance Of Tadpoles In The Hybridogenetic *Rana esculenta* Complex». *Amer. Soc. Zoologists* 31 (5): A92–A92.

274. Semlitsch, Raymond D., i Heinz-Ulrich Reyer. 1992. «Performance of Tadpoles from the Hybridogenetic *Rana esculenta* Complex: Interactions with Pond Drying and Interspecific Competition». *Evolution* 46 (3): 665.
<https://doi.org/10.2307/2409636>.
275. Shabanov, D. A., A. V. Korshunov, M.A. Kravchenko, E.V. Meleshko, A.V. Shabanova, i E.E. Usova. 2014. «The intrapopulation developmental strategies of precocity and stuntedness: determination by the example of anurans», *Biology*, 22 (1126): 115–24.
276. Shabanov, D.A., O.V. Korshunov, i M.O. Kravchenko. 2009. «Which of the water frogs inhabit Kharkiv oblast? Perspectives on terminology and nomenclature.» *Biologiâ ta valeologiâ* 11: 116–25.
277. Shabanov, Dmytro, Olena Usova, Marina Kravchenko, Olha Biriuk, Anton Leonov, Olexiy Korshunov, Quentin Mair, Olena Meleshko, Julian Newman, i Grygoriy Zholtkevych. 2015. «Sustainable Coexistence of the Parental Species and Hemiclonal Interspecific Hybrids Is Provided by the Variety of Ontogenetic Strategies». *Herpetological Facts Journal*, вип. 2: 35–43.
278. Shabanov, Dmytro, Marina Vladymyrova, Anton Leonov, Olga Biriuk, Marina Kravchenko, Quentin Mair, Olena Meleshko, Julian Newman, Olena Usova, i Grygoriy Zholtkevych. 2020. «Simulation as a Method for Asymptotic System Behavior Identification (e.g. Water Frog Hemiclonal Population Systems)». В *Information and Communication Technologies in Education, Research, and Industrial Applications*, edited by Vadim Ermolayev, Frédéric Mallet, Vitaliy Yakovyna, Heinrich C. Mayr, i Aleksander Spivakovsky, 1175:392–414. Kherson: Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-39459-2_18.
279. Sherman, Craig D. H., Erik Wapstra, Tobias Uller, i Mats Olsson. 2008. «Male and Female Effects on Fertilization Success and Offspring

- Viability in the Peron's Tree Frog, *Litoria peronii*». *Austral Ecology* 33 (3): 348–52. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2007.01823.x>.
280. Shi, Yun-Bo. 2000. *Amphibian Metamorphosis : From Morphology to Molecular Biology*. US: John Wiley & Sons, Inc.
281. Shumway, Waldo. 1940. «Stages in the Normal Development of *Rana pipiens* I. External Form». *The Anatomical Record* 78 (2): 139–47. <https://doi.org/10.1002/ar.1090780202>.
282. Shumway, Waldo. 1942. «Stages in the Normal Development of *Rana Pipiens*. II. Identification of the Stages from Sectioned Material». *The Anatomical Record* 83 (2): 309–15. <https://doi.org/10.1002/ar.1090830209>.
283. Siervatovska, Y., i U. Teplenko. 2018. «Determination of the composition of the water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Lower Dobritskyi pond». В *Матеріали XIII Міжнародної конференції молодих учених*, 169–71. Харків: Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна.
284. Som, Christian, R. Bradley Anholt, i Heinz-Ulrich Reyer. 2000. «The Effect of Assortative Mating on the Coexistence of a Hybridogenetic Waterfrog and Its Sexual Host». *The American Naturalist* 156 (1): 34–46. <https://doi.org/10.1086/303372>.
285. Stakh, V., O. Reshetylo, i I. Khamar. 2016. «Inter-population morphometric variability of *Pelophylax ridibundus* (Anura, Amphibia) in the water bodies of Lviv province». *Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна.*, вип. 72: 180–86.
286. Stakh, V.O., i I.S. Khamar. 2014. «Morphological Changeability of Green Frogs (*Pelophylax*) in the Basins of Lviv Region and Shatsk National Natural Park». *Природа Західного Полісся та прилеглих територій*, вип. 11: 296–301.
287. Stakh, V.O., I.S. Khamar, O.S. Reshetylo, i Yu.M. Zabytivskyi. 2017. «Phenes of water frogs (*Pelophylax*) as the indicators of water bodies'

- contamination in Pre-Carpathians, Roztochia, Lesser and Western Polissia». *Біологічні Студії - Studia Biologica*. 11 (1): 161–68.
288. Stakh, V.O., Iu.M. Strus, i I.S. Khamar. 2018. «Genetic diversity of population systems in green frogs (*Pelophylax esculentus* complex) in water bodies of western Ukraine». *Біологічні Студії - Studia Biologica*. 12 (3–4): 17–26.
289. Stöck, Matthias, Dmitrij Dedukh, Radka Reifová, Dunja K. Lamatsch, Zuzana Starostová, i Karel Janko. 2021. «Sex Chromosomes in Meiotic, Hemiclonal, Clonal and Polyploid Hybrid Vertebrates: Along the ‘extended Speciation Continuum’». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376 (1833): 20200103.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0103>.
290. Strus, Vasylyna, Iurii Strus, i Ihor Khamar. 2023. «Species and Hybrid Composition and Genetic Diversity of Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex) in Western Ukrainian Hemiclonal Population Systems». *Studia Biologica* 17 (3): 67–84. <https://doi.org/10.30970/sbi.1703.726>.
291. Sumida, Masayuki, Naoki Satou, Natsuhiko Yoshikawa, Atsushi Kurabayashi, Mohammed Mafizul Islam, Takeshi Igawa, Shohei Oumi, et al. 2011. «Artificial Production and Natural Breeding of the Endangered Frog Species *Odorrana ishikawae*, with Special Reference to Fauna Conservation in the Laboratory». *Zoological Science* 28 (11): 834–39.
<https://doi.org/10.2108/zsj.28.834>.
292. Sumner, A. T., H. J. Evans, i R. A. Buckland. 1973. «Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa: I. The effects of fixation in methanol-acetic acid». *Experimental Cell Research* 81 (1): 214–22. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90128-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90128-6).
293. Suriadna, N. M., G. I. Mykytynets, M. Pupiňš, i V. Y. Gasso. 2020. «Population Systems of Eurasian Water Frogs (*Pelophylax*) in the South of Ukraine». *Biosystems Diversity* 28(2):154-62. <https://doi.org/10.15421/012021>.

294. Suriadnaia, N.N. 2015. «The Morphology Of The Chromosomes Of Triploid *Pelophylax esculentus* (Anura, Ranidae) Of Ukraine». *Збірник праць зоологічного Музею* 46: 85–95.
295. Suryadna, N.N. 2010. «New records of triploids *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) in Eastern Ukraine». *Современная герпетология* 10 (3/4): 128–31.
296. Szydłowski, Paweł, Magdalena Chmielewska, Beata Rozenblut-Kościsty, i Maria Ogielska. 2017. «The Frequency of Degenerating Germ Cells in the Ovaries of Water Frogs (*Pelophylax esculentus* Complex)». *Zoomorphology* 136 (1): 75–83. <https://doi.org/10.1007/s00435-016-0337-4>.
297. Tata, Jamshed R. 2006. «Amphibian Metamorphosis as a Model for the Developmental Actions of Thyroid Hormone». *Molecular and Cellular Endocrinology* 246 (1–2): 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.024>.
298. Taylor, A. Cecil, i Jerry J. Kollros. 1946. «Stages in the Normal Development of *Rana pipiens* Larvae». *The Anatomical Record* 94 (1): 7–23. <https://doi.org/10.1002/ar.1090940103>.
299. Tecker, Anuschka, Christian Göcking, Norbert Menke, Robert Schreiber, i Jörg Plötner. 2017. «Neue Daten zur Morphologie, Genetik und Verbreitung der Wasserfrösche (*Pelophylax spp.*) im Münsterland (NRW) unter besonderer Berücksichtigung des Kleinen Wasserfroschs (*Pelophylax lessonae*)». *Zeitschrift für Feldherpetologie* 24: 19–44.
300. Terentiev, P.V. 1950. *Lyagushka [In Russian]*. Laboratornye zhyvotnye. Moscow: Sovetskaya nauka.
301. Thibaudeau, Giselle, i Ronald Altig. 2012. «Coloration of Anuran Tadpoles (Amphibia): Development, Dynamics, Function, and Hypotheses». *ISRN Zoology* 2012: 1–16. <https://doi.org/10.5402/2012/725203>.
302. Tkachenko, O. V. 2017. «Eight Species of Anuran Amphibians (Amphibia, Anura) Found in Ukraine: Comparative Morphology and

- Classification of Larval Development Stages». *Vestnik Zoologii* 51 (4): 343–48. <https://doi.org/10.1515/vzoo-2017-0039>.
303. Tkachenko, O. V. 2019. «The morphology of the larvae of anurans (Anura, Amphibia) of the fauna of Ukraine (In Ukrainian)». Autorepherat of dissertation to obtain the scientific degree of candidate in biological sciences within the specialization 03.00.08-zoology, Kyiv: I. I. Shmalgausen Institute of Zoology of NAS of Ukraine.
304. Todd, Brian D., David E. Scott, Joseph H. K. Pechmann, i J. Whitfield Gibbons. 2011. «Climate Change Correlates with Rapid Delays and Advancements in Reproductive Timing in an Amphibian Community». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278 (1715): 2191–97. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1768>.
305. Tunner, Heinz G. 1974. «Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation». *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 12 (1): 309–14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1974.tb00173.x>.
306. Tunner, Heinz G., i Laszlo Karpati. 1997. «The Water Frogs (*Rana esculenta* complex) of the Neusiedlersee region (Austria, Hungary) (Anura: Ranidae)». *Herpetozoa* 10 (3/4): 139–48.
307. Tunner, H.G. 1973. «Demonstration of the hybrid origin of the common green frog *Rana esculenta* L.» *Naturwissenschaften* 60 (10): 481–82.
308. Tunner, H.G., i S. Heppich. 1981. «Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*». *Naturwissenschaften* 68 (4): 207–8.
309. Tunner, H.G., i S. Heppich-Tunner. 1991. «Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis a hybrid frog». *Naturwissenschaften* 78 (1).
310. Usova, E.E. 2010. «Determining the level of mature water frogs (*Pelophylax esculentus* complex; Amphibia, Ranidae) natural mortality by use

- of skeletochronology». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 12 (920): 104–10.
311. Usova, O.E., M.O. Kravchenko, i D.A. Shabanov. 2015. «The water frogs' (*Pelophylax esculentus* complex) intrapopulation ontogenetic strategies». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 25: 223–38.
312. Uzzell, Thomas, i Leszek Berger. 1975. «Electrophoretic Phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and Their Hybridogenetic Associate, *Rana esculenta*». *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 12: 13–24.
313. Vegerina, A.O., O.V. Meleshko, I.S. Pyrina, V.O. Sapozhnikova, i O.V. Biryuk. 2013. «The determination of the ratio of diploid and triploid green frogs underyearlings from the *Pelophylax esculentus* complex Seversky Donets diversity center». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Biology*, 18 (1079): 107–13.
314. Videvall, Elin, Pablo Burraco, i Germán Orizaola. 2022. «Impact of Ionizing Radiation on the Environmental Microbiomes of Chernobyl Wetlands». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.01.17.476627>.
315. Vinogradov, Alexander E, i Alexander T Chubinishvili. 1999. «Genome Reduction in a Hemiclonal Frog *Rana esculenta* From Radioactively Contaminated Areas». *Genetics* 151 (3): 1123–25. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.3.1123>.
316. Vitt, Laurie J., i Janalee P. Caldwell. 2014. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4th edition. Academic Press.
317. Volpe, E. Peter, i Dobie. 1959. «The larva of the oak toad, *Bufo quercicus* Holbrook». *Tulane Studies in Zoology*, вип. 7: 145–52.
318. Vorburger, Christoph. 2001a. «Fixation Of Deleterious Mutations In Clonal Lineages: Evidence From Hybridogenetic Frogs». *Evolution* 55 (11): 2319–32. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00745.x>.

319. Vorburger, Christoph. 2001b. «Non-hybrid Offspring from Matings between Hemiclonal Hybrid Waterfrogs Suggest Occasional Recombination between Clonal Genomes». *Ecology Letters* 4 (6): 628–36.
<https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00272.x>.
320. Walls, Susan, William Barichivich, i Mary Brown. 2013. «Drought, Deluge and Declines: The Impact of Precipitation Extremes on Amphibians in a Changing Climate». *Biology* 2 (1): 399–418.
<https://doi.org/10.3390/biology2010399>.
321. Wells, Kentwood David. 2007. *The Ecology & Behavior of Amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.
322. Zahoruiko, Ye., M. Solohub-Yosef, T. Hostkina, A. Fedorova, M. Drohvalenko, i E. Pustovalova. 2021. «Water Frogs from Koriakiv Pond: Annual Monitoring of Hemiclonal Population System». В *Матеріалі Всеукраїнської Наукової Конференції «Стан і Біорізноманіття Екосистем Шацького Національного Природного Парку Та Інших Природоохоронних Територій»*, 24–26. Львів, Шацьк: СПОЛОМ, Львів.
323. Zeisset, Inga, Graham Rowe, i Trevor Beebee. 2001. «Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* and *R. lessonae*». *Molecular Ecology* 9 (8): 1173–74.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00954-2.x>.
324. Zhao, Tian, Cheng Li, Xiaoyi Wang, Feng Xie, i Jianping Jiang. 2017. «Unraveling the Relative Contribution of Inter- and Intrapopulation Functional Variability in Wild Populations of a Tadpole Species». *Ecology and Evolution* 7 (13): 4726–34. <https://doi.org/10.1002/ece3.3048>.
325. Zinenko, O., O. Korshunov, i A. Tupikov. 2014. «Amphibia and Reptilia of the National Nature Park “Dvorichanskyi”». *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: biology* 19 (1097): 68–74.

ДОДАТОК А: СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Список

наукових публікацій здобувача вищої освіти ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія
кафедри зоології та екології тварин
Дрогваленка Миколи Олександровича,
які висвітлюють наукові результати дисертації на тему
«Різноманіття складу геміклональних популяційних систем *Pelophylax
esculentus* complex в Україні та чинники, що підтримують їхню стійкість»

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати
дисертації:**

Публікації у зарубіжних наукових виданнях, що входять до
наукометричних баз Scopus або Web of Science:

1. Drohvalenko M., Fedorova A. The First Evidence of Triploidy among *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Ranidae) in the Chernobyl Exclusion Zone. Bonn Zoological Bulletin. 2022. Vol. 71, no. 2. P. 105-108.
DOI: <https://doi.org/10.20363/BZB-2022.71.2.105>
Abstract: *Pelophylax esculentus* complex hemiclinal systems are a unique evolutionary object due to intricate mechanisms of their sustainability at genomic, gamete, and developmental levels. Chernobyl Exclusion Zone (Ukraine) presents a no less unique object of nature evolution under the unprecedented radiation impact and human pressure decrease. By measuring erythrocyte lengths, we report the first findings of triploid hybrid frogs *P. esculentus* from two localities in Chernobyl Exclusion Zone, where diploid hybrids only were reported before. The presence of triploids implies high complexity of the local water frog population systems, enabling new research opportunities.

Key words: water frog, hybrid, population system, erythrocyte

URL: https://zoologicalbulletin.de/BzB_Volumes/Volume_71_2/105_drohvalenko_20220915.pdf

2. Fedorova Anna, Pustovalova Eleonora, Drohvalenko Mykola. High Frequency of Hindlimb Malformation in Froglets *Pelophylax sp.* in Ukraine. The Herpetological Bulletin. 2023. Vol. 164. P. 24-25.

DOI: <https://doi.org/10.33256/hb164.2425>

Abstract: —

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>

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

1. Drohvalenko M., Pustovalova E., Fedorova A. First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh River basin (Kharkiv region, Ukraine). Biodiversity, ecology and experimental biology. 2021. Vol. 23, no. 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*, hemiclonal population system, hybrid, triploid

URL: <http://journals.hnpu.edu.ua/index.php/biology/article/view/3834/3911>

2. Drohvalenko, M. O. Tadpole Morphology Features of Different *Pelophylax esculentus* complex Forms. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. 2021. Vol. 37. P. 51-64.

DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-4>

Abstract: Complicated relationships between different forms of *Pelophylax*

esculentus complex are strongly connected to their reproduction modes. Stability of the hemiclinal population systems including variety of hybrids is provided by balance between gamete production patterns and selective death of offspring portion. A direct way to study such mechanisms is to investigate the ontogeny of different forms – that means studying their tadpoles. However, there are still no suitable methods to morphologically distinguish the known diversity of hybrid forms ($2n$ and $3n$ of different genomic composition) from the naturally diverse parental species at the tadpole stage. The present work is aimed to investigate external quantitative (measurements-based) and coloration features for tadpoles of parental species (*P. lessonae*, *P. ridibundus* “pure” and triploid-born) and of two *P. esculentus* forms (progeny of unusual LLR-females and diploid hybrids). For this purpose, the set of experimental artificial crossings were established and larvae were reared under similar conditions (equal water volume, light, temperature and feeding regimes). Species and ploidy of experimental frogs were identified using external morphology features, microscopic cytometry of blood cells, karyology of intestine mitotic cells and microsatellite analysis. Coloration of different body parts were scored visually using microscope; measuring was performed by microscopic photographing with scale and further measuring using AxioVision soft. Measurements were analyzed via multidimensional analyses (PCA, discriminant, canonical), and appeared weakly applicable taken both together and separately. It allowed us only to partly separate progeny of two parental species from each other and from progeny of unusual triploid hybrids. States combinations of coloration features appeared to be specific for each form taken into analysis, but only at the particular age range. Specificities of triploid and different *P. ridibundus* groups can be explained by natural variability as well as by peculiar processes in hybridogenetic systems.

Key words: water frogs, larvae, development, progeny, hybrid, triploid

URL: <https://periodicals.karazin.ua/biology/article/view/18843/17576>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Biliaiev, I., H. Bondarenko, D. Harbuz, M. Drohvalenko, Y. Siervatovska, U. Sudarenko, U. Teplenko, A. Fedorova, D. Shabanov. Composition and changes of three hemiclinal population systems of water frogs from NNP 'Gomilshanski lisy'. Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій». 2018. С. 18–21. Шацьк: Львів : СПОЛОМ.
2. Drohvalenko, M.O., A.O. Fedorova, E.S. Pustovalova, P. Mikulíček. Molecular Data in Studies of Reproduction in Hemiclinal Population Systems of *Pelophylax esculentus* complex. Матеріали шостої міжнародної науково-практичної конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt Путила, 12-13 жовтня 2023 р.). 2023. (in print)
3. Fedorova, A.O., M.O. Drohvalenko, E.S. Pustovalova. Unusual ratio of hybrids among juvenile water frogs in Lower Dobrytskyi pond. Abstract book of the. 2018. Т. 12. С. 22–23. Kiev, Institute of zoology: Zoological courier. <http://izan.kiev.ua/rmd/KMDZ18-abstr.pdf>.
4. Pustovalova, E., A. Fedorova, M. Drohvalenko. Exploring *Pelophylax esculentus* systems: first records of triploids in the Mozh river basin. Матеріали всеукраїнської наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій». 2021. С. 13-16. Львів, Шацьк: Львів: СПОЛОМ.
5. Shabanov, V., A. Kryvoltsevych, A. Zhadan, O. Podpryatov, A. Fedorova, M. Drohvalenko, E. Pustovalova. Monitoring of the State of HPS of Water Frogs Located in Lower Dobrytskyi Pond. Матеріали Всеукраїнської Наукової Конференції «Стан і Біорізноманіття Екосистем Шацького Національного

- Природного Парку Та Інших Природоохоронних Територій. 2021. С. 16-18. Львів, Шацьк: СПОЛОМ, Львів.
6. Zahoruiko, Ye., M. Solohub-Yosef, T. Hostkina, A. Fedorova, M. Drohvalenko, i E. Pustovalova. Water Frogs from Koriakiv Pond: Annual Monitoring of Hemiclonal Population System. Матеріали Всеукраїнської Наукової Конференції «Стан і Біорізноманіття Екосистем Шацького Національного Природного Парку Та Інших Природоохоронних Територій». 2021. С. 24-26. Львів, Шацьк: СПОЛОМ, Львів.
7. Дрогваленко Микола, Федорова Анна. Дослідження геміклональних популяційних систем зелених жаб зони відчуження. Літопис природи. Київ: Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник. 2022. Т. 5. С. 191-194. URL: https://zapovidnyk.org.ua/files-pdf/litopys_2021_tom_5.pdf

Наукові праці, що додатково відображають результати дисертації:

1. Drohvalenko M. Extended Breeding of the Marsh Frog, *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771). Reptiles & Amphibians. 2021. Vol. 28, no. 1. P. 37-39.
DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v28i1.15301>
Abstract: —
Key words: *Pelophylax*, reproduction, amphibians, phenology, tadpole
URL: <https://journals.ku.edu/reptilesandamphibians/article/view/15301/13854>
2. Drohvalenko Mykola, Fedorova Anna, Pustovalova Eleonora. Unexpected Heterochrony in Edible Frog (*Pelophylax esculentus* Linnaeus 1758) and Pallas' Spadefoot (*Pelobates vespertinus* Pallas 1771) in Eastern Ukraine. Reptiles & Amphibians. 2022. Vol. 29, no. 1. P. 472-474.
DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>
Abstract: —
Key words: reproduction, amphibians, anomaly, metamorph, *Pelophylax*, *Pelobates*
URL: <https://journals.ku.edu/reptilesandamphibians/article/view/17056/16979>

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 13:03:51 11.12.2023

Назва файлу з підписом: Дисертація_ДрогваленкоМО_03.12.23.pdf.p7s
Розмір файлу з підписом: 5.5 МБ

Назва файлу без підпису: Дисертація_ДрогваленкоМО_03.12.23.pdf
Розмір файлу без підпису: 5.5 МБ

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

Підписувач: ДРОГВАЛЕНКО МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ

П.І.Б.: ДРОГВАЛЕНКО МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ

Країна: Україна

РНОКПП: 3491106554

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 18:51:18
03.12.2023

Сертифікат виданий: АЦСК АТ КБ «ПРИВАТБАНК»

Серійний номер: 248197DDFAB977E5040000006DE61801A2185B04

Тип носія особистого ключа: Незахищений

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підпис та дані в одному файлі (CAAdES enveloped)

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

Сертифікат: Кваліфікований