

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації
Пустовалової Елеонори Сергіївни
«Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб
(*Pelophylax esculentus complex*)»

яка подається на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 – Біологія
за спеціальністю 091 – Біологія

1. Оцінка роботи здобувача у процесі підготовки дисертації і виконання індивідуального плану навчальної та наукової роботи.

Аспірантка Пустовалова Елеонора Сергіївна виконала у повному обсязі Індивідуальний план Освітньо-наукової програми підготовки доктора філософії. Освітня програма в обсязі 40 кредитів ECTS виконана у повному об'ємі. Вона успішно склала сім заліків та один екзамен з наступних дисциплін:

Заліки:

- 1) «Філософські засади та методологія наукових досліджень» – 91 балів;
- 2) «Підготовка наукових публікацій та презентація результатів досліджень» – 95 балів;
- 3) «Сучасна методологія біологічних досліджень» – 93 бали;
- 4) «Багатовимірні статистика» – 95 балів;
- 5) «Імітаційне моделювання динаміки та стійкості надорганізмених біосистем» – 90 балів;
- 6) «Викладацька практика» – 95 балів.

Екзамен:

- 7) Іноземна мова для аспірантів (англійська мова) – 98 балів.

Всі заплановані види робіт було виконано своєчасно. Здобувачка плідно співпрацювала з науковим керівником протягом усього терміну навчання в аспірантурі.

2. Обґрунтування вибору теми дослідження.

Біологічні види — еволюційні одиниці, які у типовому випадку відтворюються статевим шляхом. У більшості випадків статеве розмноження забезпечується утворенням редукованих генетично унікальних гамет шляхом мейозу та заплідненням. І утворення гамет, і навіть підтримка меж між статеві відтворюваними видами, забезпечується універсальними механізмами мейозу. Тим не менш, наслідком міжвидової гібридизації може стати порушення консервативних шляхів гаметогенезу, що призводить до багатьох наслідків, серед яких може реєструватися відмова від типового статевого відтворення. У гібридів часто виникають проблеми з утворенням пар між хромосомами і рекомбінацією в мейозі через розбіжність хромосом батьківського виду. Тим не менш, гібриди можуть долати стерильність завдяки роботі різноманітних цитогенетичних механізмів (наприклад, тетраплоїдизації). У багатьох випадках спостерігаються премейотичні або мейотичні зміни у шляхах гаметогенезу, що призводить до утворення клональних гамет. Такі зміни можуть бути причиною різноманітних природних клональних і геміклональних способів відтворення, таких як партеногенез, андрогенез, гіногенез,

клеттогенез і гібридогенез. Таким чином, премейотичні або мейотичні зміни руйнують бар'єри між статевим розмноженням і клональністю. Крім того, ці зміни можуть сприяти еволюційному успіху гібридних ліній і гібридного видоутворення. Незважаючи на тривалу історію вивчення гібридів, які демонструють зміни у шляхах їх гаметогенезу, особливості процесу утворення їх гамет лишаються недостатньо вивченими. Більше за те, механізми збереження клональних ліній у популяційних системах і те, як вони впливають на батьківські види, все ще залишається недостатньо вивченими.

Зелені жаби, які утворюють *Pelophylax esculentus* complex, є чудовою групою для дослідження міжвидових гібридів. Їх примітною особливістю є клональне відтворення одного з батьківських геномів у гібридів. Цей комплекс включає два батьківські види, *P. lessonae* (Camerano, 1882) і *P. ridibundus* (Pallas, 1771). Їхня міжвидова гібридизація спричинила утворення диплоїдних гібридів *P. esculentus* (Linnaeus, 1758). Під час гібридного гаметогенезу один із батьківських геномів видаляється з клітин до початку мейозу, а другий геном ендореплікується та передається у гаметах клонально без рекомбінації. У разі, якщо такі гібридні жаби схрещуються з представниками батьківського виду, геном якого був видалений, у потомстві буде відтворено гібридний генотип. Біосистеми, в яких відбувається відтворення гібридних жаб, названо геміклональними популяційними системами (ГПС). Склад ГПС завжди пов'язаний з особливостями гаметогенезу гібридів *P. esculentus*, що до них входять. У більш поширених популяційних системах з особинами *P. lessonae* (L-E-ГПС) гібриди передають геном *P. ridibundus* у гаметах. Гібриди також можуть співіснувати з *P. ridibundus* (R-E-ГПС). Такі ГПС характерні для двох географічних територій, одна з яких розташована в басейні річки Одер у Центральній Європі, а друга – у декількох річках Східної України. У R-E-ГПС *P. esculentus* демонструють специфічний характер гаметогенезу. В багатьох популяційних системах *P. esculentus* complex разом з диплоїдними гібридами (генотип LR, $2n = 26$) співіснують триплоїдні і навіть тетраплоїдні особини. В природі виявлено дві форми триплоїдних жаб, що відрізняються за геномним набором. В одному варіанті триплоїдна особина має один геном *P. lessonae* і два геноми *P. ridibundus* (генотип LRR, $3n = 39$), а в іншому – два геноми *P. lessonae* і один геном *P. ridibundus* (генотип LLR, $3n = 39$). Масове існування триплоїдів зареєстровано у північній Німеччині, Данії, південній Швеції, західній Польщі та західній Угорщині, а також у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб (Україна). Триплоїди у таких ГПС грають роль постачальника рекомбінантних геномів та відтворюються завдяки диплоїдним гібридам, що продукують клональні диплоїдні гамети LR.

Одним із ще не вивчених репродуктивних механізмів є здатність самців *P. esculentus* із R-E-ГПС продукувати два типи гамет одночасно. Це явище було названо "гібридна амфіспермія". Беручи до уваги, що самки *P. esculentus* із R-E-систем також здатні продукувати декілька типів гамет одночасно, було запропоновано змінити назву цього феномену на "гібридна амфігаметність". Різноманіття гамет типових статево відтворюваних видів пов'язано з рекомбінацією у мейозі. Випадок *P. esculentus* є іншим: це єдині відомі науці істоти, які здатні одночасно продукувати гамети з клональним геномом від батька (гаплоїдний геном *lessonae*) і клональним геномом від матері (гаплоїдний геном *ridibundus*). Механізми, які забезпечують таких характер гаметогенезу ще не відомі і заслуговують на детальне дослідження.

Метою дисертації є встановлення особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Для досягнення поставленої мети сформульовано наступні ключові завдання:

1. Обрати модельні геміклональні популяційні системи (ГПС) *Pelophylax esculentus* complex у складі Сіверсько–Донецького центру різноманіття зелених жаб, до складу яких входять диплоїдні гібридні самці.
2. ~~Визначити особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних~~ клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *P. esculentus* із визначених модельних ГПС.
3. Встановити шляхи гаметогенезу у досліджених гібридних самців; визначити внесок таких гібридів у підтримання складу ГПС, до яких вони входять.

~~Об'єктом дослідження є диплоїдні гібридні самці *Pelophylax esculentus* з характерних~~ геміклональних популяційних систем Сіверсько–Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Предметом дослідження є особливості гаметогенезу, що забезпечують відтворення досліджуваних геміклональних міжвидових гібридів

Методи дослідження. Попереднє визначення виду та визначення статі проводилося за ~~комплексом морфологічних ознак.~~ Визначення плідності проводилося методом цитометрії еритроцитів, які, за даними численних досліджень, у триплоїдів є більшими, ніж у диплоїдів. Згодом, плідність було підтверджено методом Ag-фарбування хромосом та ядер соматичних клітин, яке дозволяє виявити райони ядерцевих організаторів. Для підтвердження видової приналежності, ми використовували методику DAPI фарбування хромосом із соматичних ~~тканин.~~ Метод полягає у тому, що барвник DAPI накопичується в районі центромери, при чому центромерні ділянки хромосом *P. ridibundus* мають інтенсивне світіння на відміну від центромерних ділянок хромосом *P. lessonae*. Хромосоми гібридів у свою чергу демонструють світіння центромери тільки у наборі, отриманому від *P. ridibundus*. Остаточне підтвердження виду та визначення геному в клітинах сім'яників проводилося за допомогою методики ~~флуоресцентної гібридизації in situ (FISH).~~ Метод базується на тому, що зонд із перичентромерною послідовністю RrS1 є видоспецифічним до всіх хромосом *P. ridibundus*, а зонд із перичентромерною послідовністю Ples289, є видоспецифічним для I0 та II пар хромосом *P. lessonae*. У випадку диплоїдних гібридів, ми спостерігаємо світіння центромерної ділянки на 13 хромосомах *P. ridibundus* та два сигнали на I0 та II хромосомах *P. lessonae*. Додатково, ~~визначення виду та геному в клітинах сім'яників проводилося за допомогою методики~~ порівняльної гібридизації геномів (CGH), яка базується на тому, що виділена геномна ДНК батьківських видів зв'язується з ДНК хромосом і таким чином ми бачимо мітотичні та мейотичні хромосоми, забарвлені у різний колір, який відповідає геному *P. lessonae* або *P. ridibundus*.

~~3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.~~

Дисертаційна робота виконана на базі біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. У зв'язку з повномасштабним вторгненням роботу над дисертацією було продовжено на базі Інституту фізіології та генетики тварин, м. Лібехов (Чеська Республіка) під керівництвом д-ра Лукаса Холеви та д-ра Дмитра Дідуха; ~~грант № RREU 22-21 (01.05.2022 – 31.12.2023), Researchers at Risk Fellowship – UKRAINE,~~ наданий Чеською академією наук (the Czech Academy of Sciences (CAS)).

4. **Особистий внесок дисертанта в отриманні наукових результатів та їх новизна.**

Особистий внесок дисертанта в отриманні наукових результатів та їх новизна полягає в

наступному:

Вперше:

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

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

3) ~~Описано шість шляхів гаметогенезу у гібридних самців:~~

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

4) Показано, що більшість проаналізованих сперматоцитів та сперматид (60%) мали геном R, та лише 33% сперматоцитів та сперматид мали геном L. Це не відповідає наявним науковим уявленням, згідно з якими гібриди продукують переважно гамети із геномом виду, який відсутній в ГПС, де вони відтворюються (як це відбувається в L-E-ГПС, де гібриди передають геном R) і свідчить про своєрідність механізмів підтримання стійкості в R-E-ГПС.

5) Встановлено, що наявність 14% анеуплоїдних клітин серед проаналізованих сперматоцитів та сперматид свідчить про недосконалість регуляції елімінації та ендореplikації у клітинах зародкової лінії міжвидових гібридів.

Дістало подальший розвиток:

1) Дослідження гаметогенезу гібридних диплоїдних самців *Pelophylax esculentus*.

5. Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, які захищаються.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, результатів і висновків дисертації Пустовалової Е. С. забезпечена коректним застосуванням сучасних цитологічних методів, а також ретельним співставленням одержаних результатів із широким колом періоджерел наукової літератури. Основні результати дисертаційного дослідження опубліковані в науковому журналі індексованому наукометричною базою Scopus (Q1) та журналах, які входять до переліку наукових фахових видань України та доповідалися на міжнародних наукових конференціях. Висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

6. Наукове, теоретичне та практичне значення результатів дисертації.

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

7. Повнота викладення матеріалів дисертації в роботах, опублікованих автором.

Основні результати дисертації відображені у вигляді 1 публікації в закордонному науковому виданні, проіндексованому у базах даних Web of Science та Scopus (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank і / або Journal Citation Reports та 2 статті у виданнях, що на момент публікації входять до переліку наукових фахових видань України. Результати, які додатково відображають наукові результати дисертації опубліковану у вигляді 2 публікацій в закордонному науковому виданні, проіндексованому у базах даних Scopus (Q2 і Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank і / або Journal Citation Reports та 2 статті у виданні, що індексується іншими науковими базами. Також, опубліковано 8 тез у 4 конференціях.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

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

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

Abstract: Interspecific hybridization can disrupt canonical gametogenic pathways, leading to the emergence of clonal and hemiclinal organisms. Such gametogenic alterations usually include genome endoreplication and/or premeiotic elimination of one of the parental genomes. The hybrid frog *Pelophylax esculentus* exploits genome endoreplication and genome elimination to produce haploid gametes with chromosomes of only one parental species. To reproduce, hybrids coexist with one of the parental species and form specific population systems. Here, we investigated the mechanism of

spermatogenesis in diploid *P. esculentus* from sympatric populations of *P. ridibundus* using fluorescent *in situ* hybridization. We found that the genome composition and ploidy of germ cells, meiotic cells, and spermatids vary among *P. esculentus* individuals. The spermatogenic patterns observed in various hybrid males suggest the occurrence of at least six diverse germ cell populations, each with a specific premeiotic genome elimination and endoreplication pathway. Besides co-occurring aberrant cells detected during meiosis and gamete aneuploidy, alterations in genome duplication and endoreplication have led to either haploid or diploid sperm production. Diploid *P. esculentus* males from mixed populations of *P. ridibundus* rarely follow classical hybridogenesis. Instead, hybrid males simultaneously produce gametes with different genome compositions and ploidy levels. The persistence of the studied mixed populations highly relies on gametes containing a genome of the other parental species, *P. lessonae*.

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

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

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

1. Drohvalenko M., Fedorova A., Pustovalova E., Shabanov D. First finding of triploid hybrid frogs *Pelophylax esculentus* (Anura: Ranidae) in Mozh river basin (Kharkiv region, Ukraine). *Biodiversity, ecology and experimental biology*. 2021. No. 23, 2. P. 61-67. DOI: <https://doi.org/10.34142/2708-5848.2021.23.2.04>.

Abstract: *Pelophylax esculentus* is an interspecies hybrid of marsh frog *P. ridibundus* and pool frog *P. lessonae*. The hybrids are usually presented by diploid and triploid forms, and coexist and crossbreed with one or both parental species in the hemiclinal population systems (HPS). Siverskyi Donets river basin is known for its diversity of HPS and was described as Siverskyi Donets center of water frogs diversity. Three subregions were described within it based on the HPS composition features (diploid R-E, triploid-containing R-E-Ep and R-Epf with triploid females only among hybrids). The presence of triploid *P. esculentus* was earlier confirmed only for two of three subregions of the Siverskyi Donets river basin, while the third, R-E subregion (including Mozh river) was thought to be inhabited by only diploids. Here we present the results of analysis on ploidy and genome composition of both adult and juvenile water frogs in a pond in the Tymchenky village (Mozh river basin, Kharkiv region, Ukraine). Three samples of frogs were collected in September 2019, June 2020, and August 2021 (109 adults and 56 juveniles in total) and analyzed using microscopic erythrocyte cytometry (dry smears), karyology of bone marrow, fluorescent staining (with DAPI) and analysis of morphological features. We identified 2 triploid males among adults and 5 triploids of both sexes among juveniles. The overall triploid ratio between ages changed drastically (9% among juveniles vs 1% among adults), but insignificantly ($p=0.078$). The erythrocyte size indicating margin between adult di- and triploids was established as 28 μm for this system; for juveniles such margin is quite unclear. All triploids had genome composition LLR (i.e. two genomes of *P. lessonae* and one genome of *P. ridibundus*). By the majority of diploid *P. esculentus* and the presence of triploids, Tymchenky system appeared similar to some HPSs (Koriakiv, Iskiv systems) in other subregions, known for triploid presence. The presence of triploids, contrary to previous data on this region, may be explained by several hypotheses: (1) rare

observation of triploids; (2) migration of either triploids or *P. esculentus* producing $2n$ -gametes; (3) a newly evolved feature of local *P. esculentus* reproduction.

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

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

2. Pustovalova E., Fedorova A. What the distribution of sperm size can tell about the stability of spermatogenesis in hybrid frogs *Pelophylax esculentus*. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*. 2021. No. 37. P. 70–78. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-6>

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

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

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

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

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

Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas”, International Zoological Conference, September 12-15, 2019, Lviv, Shatsk, Ukraine. P. 8-10.

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

3. Pustovalova E., Fedorova A., Pereslavskaya K., Verchoturova P. Hemiclonal population system of water frogs in Lower Dobrytskyi pond: results of annual monitoring. 14th International young scientists' conference “Biology: From a Molecule Up to The Biosphere”, November 27 – 29, 2019, Kharkiv, Ukraine. P. 185-186.

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

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

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

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

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

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

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue derived from the tail tips of tadpoles. *Journal of Vertebrate Biology*. 2022. No. 71(22010). P. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.25225/jvb.22010> (Scopus, Web of Science, Q2, IF=1.46).

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

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

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

2. Kryvoltsevich A., Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. Anomalies in Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) and hybrid waterfrogs (*P. esculentus*) (Anura: Ranidae) from two ponds in the Kharkiv Region of Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 2022. No. 29(1). P. 204–209. DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.16446>.

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

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

3. Drohvalenko M., Fedorova A., Pustovalova E. Unexpected heterochrony in Edible Frog (*Pelophylax esculentus* Linnaeus 1758) and Pallas' Spadefoot (*Pelobates vespertinus* Pallas 1771) in Eastern Ukraine. *Reptiles & Amphibians*. 2022. 29(1). P. 472–474. DOI: <https://doi.org/10.17161/randa.v29i1.17056>

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

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

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

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

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

8. Дотримання академічної доброчесності

На підставі вивчення тексту дисертації здобувача, наукових праць здобувача та Протоколу контролю оригінальності (перевірку наявності текстових запозичень виконано в антиплагіатній інтернет системі [StrikePlagiarism.com](https://www.strikeplagiarism.com)) встановлено, що дисертаційна робота виконана самостійно, текст дисертації не містить плагіату, а дисертація відповідає вимогам академічної доброчесності. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

9. Оцінка мови та стилю дисертації

Матеріал дисертації викладено в логічній послідовності та доступний для сприйняття. Дисертація написана науковим стилем мовлення, структура дисертації відповідає алгоритму здійсненого автором дослідження. Зміст, структура, оформлення дисертації та кількість публікацій відповідають вимогам відповідно постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (постанова Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України від 21.03.2022 року № 341), Наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки

України від 31.05.2019 року № 759).

10. Відповідність змісту дисертації спеціальності з відповідної галузі знань, з якої вона подається до захисту.

За своїм фаховим спрямуванням, науковою новизною і практичною значимістю дисертаційна робота Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus complex*)» відповідає спеціальності 091 – Біологія. Здобувачкою повністю виконана освітня та наукова складові освітньо-наукового рівня вищої освіти.

11. Результати обговорення та проведення презентації. Рекомендація дисертації до захисту.

Здобувачка представила основні результати досліджень своєї дисертаційної роботи на розширеному засіданні кафедри зоології та екології тварин біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № ___ від 13 листопада 2023 року) у формі презентації та наукової дискусії після її завершення.

Враховуючи високий рівень виконаних досліджень, а також актуальність теми роботи, наукову новизну результатів та їх наукове і практичне значення, на розширеному засіданні кафедри було одностайно ухвалене рішення про рекомендацію дисертації Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus complex*)» до захисту в спеціалізованій вченій раді для здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія з галузі знань 09 – Біологія.

В.о. завідувача кафедри
зоології та екології тварин
біологічного факультету
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна,
кандидат біологічних наук, доцент

Тетяна АТЕМАСОВА