

АНОТАЦІЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ефективним є проведення лабораторних схрещувань і аналіз складу отриманого потомства.

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

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

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

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

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

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

ANNOTATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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