

Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0824U000471

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 17-01-2024

Статус: Наказ про видачу диплома

Реквізити наказу МОН / наказу закладу: Наказ ХНУ імені В. Н. Каразіна № 0302-Зк/311 від 06.03.2024 р.



II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

- Пустовалова Елеонора Сергіївна
- Eleonora Pustovalova

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-8396-4045

Вид дисертації: доктор філософії

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 091

Назва наукової спеціальності: Біологія та біохімія

Галузь / галузі знань: біологія

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Біологія

Дата захисту: 19-02-2024

Спеціальність за освітою: Біологія

Місце роботи здобувача: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Код за ЄДРПОУ: 02071205

Місцезнаходження: майдан Свободи, буд. 4, Харків, Харківський р-н., 61022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): ID 3854

Повне найменування юридичної особи: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Код за ЄДРПОУ: 02071205

Місцезнаходження: майдан Свободи, буд. 4, Харків, Харківський р-н., 61022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Код за ЄДРПОУ: 02071205

Місцезнаходження: майдан Свободи, буд. 4, Харків, Харківський р-н., 61022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації: Українська

Коди тематичних рубрик: 34.19, 34.33.02

Тема дисертації:

1. Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)
2. Cytogenetic Mechanisms of Reproduction of Diploid Hybrid-Male Water Frogs (*Pelophylax esculentus*)

Реферат:

1. Дисертація присвячена гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* у Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб. Проаналізовано каріотиби та геноми диплоїдних самців із різних ГПС. У ході дослідження, встановлено шляхи гаметогенезу у гібридних самців, оцінено їхню роль у підтримці геміклональних популяційних систем у Нижньому Добрицькому, Коряковому, Іськові ставах та заплаві р. Мож. Авторка збрала зразки від 762 особин (рід *Pelophylax*) у 2016–2022 роках для таксономічного аналізу. Для класифікації використовували морфологічні ознаки. Визначення плоідності включало цитометрію еритроцитів, підтверджену Ag- і DAPI-фарбуванням хромосом і цитометрію сперми. Для підтвердження каріотипування використовували FISH і, в деяких випадках, CGH. У всіх чотирьох місцях мешкають як *P. ridibundus*, так і *P. esculentus* (ди- та триплоїдні), класифікуючи ці ГПС як R-E-Ep-ГПС. Для розуміння успішного розмноження гібридів, 52 дорослих самця *P. esculentus* були випадковим чином відібрані з різних водойм. Гаметогенез досліджували в їхніх сперматоцитах і сперматидах за допомогою FISH із зондами

Ples289 і RrS1. Серед 52 диплоїдних гібридних самців 5 мали виключно геном *P. lessonae*, 13 мали геном *P. ridibundus*, а 29 були амфігаметними. Вісім самців мали диплоїдні сперматоцити та поодинокі диплоїдні сперматиди. Незважаючи на поширену передачу генома R гібридами, значна кількість гібридів і невисока кількість дорослих особин *P. ridibundus* зустрічається щорічно в цих ГПС. Всупереч очікуванням, 60% проаналізованих клітин демонстрували геном R, що кидає виклик розумінню механізмів утворення гамет гібридами. Результати FISH виявили кон'югацію хромосом *P. lessonae* і *P. ridibundus* у біваленти у п'яти з 52 самців. Три особини показали наявність сперматид з обома геномами. Один самець демонстрував сперматоцити та сперматиди з геномом *P. ridibundus* і кілька з геномом RR. Порівняльна геномна гібридизація (CGH) підтвердила це незвичайне явище. Для двох самців з хромосомами різних видів, за допомогою CGH було зареєстроване явище успішної рекомбінації. У двох самців зустрічалися хромосоми, які не відповідали геному *P. lessonae* або *P. ridibundus*, що свідчить про причетність геному, що потенційно сприяє гібридизації. У ході дослідження виявлено шість шляхів гаметогенезу у гібридних самців *P. esculentus*: 1. Гаплоїдні гамети з геномом *P. lessonae* (L). 2. Гаплоїдні гамети з геномом *P. ridibundus* (R). 3. Гібридна амфігаметність: суміш гаплоїдних гамет з геномами L і R. 4. Диплоїдні гамети зі складом геному RR, LL та LR. 5. Анеуплоїдні гамети з кількістю хромосом, яка не кратна 13, як з L, так і з R геномами. 6. Гамети з сумішшю двох або трьох геномів, що потенційно включає рекомбінацію та інтрогресію фрагментів геному, який відмінний від геному *P. lessonae* або *P. ridibundus*. Наявність 14% анеуплоїдних клітин у проаналізованих сперматоцитах і сперматидах вказує на недосконалість регуляції елімінації та ендореplikації в зародкових клітинах міжвидових гібридів, що узгоджується з сучасними дослідженнями елімінації геному у гібридів *P. esculentus*. Анеуплоїдія розглядається як наслідок селективної премейотичної елімінації одного з геномів. Хоча механізми елімінації геному у зелених жаб не вивчені ретельно, розуміння механізмів елімінації гібридних рослин свідчить про те, що відмінності в копіях центромерного повтору у геномах батьківських видів можуть призводити до неправильного розташування та відставання хромосом *P. lessonae* під час розмноження гоноцитів. Отже, у гібридів хромосоми *P. ridibundus* можуть мати вищу ймовірність прикріплення до кінетохорів під час поділу гоноцитів, сприяючи їх більш успішному клональному переносу до гамет. Ці знахідки дають важливу інформацію про гаметогенез самців зелених жаб, включаючи амфігаметність і рекомбінацію. Дослідження значно покращує наше розуміння механізмів подолання репродуктивних бар'єрів у міжвидових гібридів, що має практичні наслідки для збереження біорізноманіття та забезпечуючи майбутні біоіндикаційні дослідження. Навчальні матеріали є цінними для таких курсів, як «Зоологія хребетних тварин», «Цитологія та клітинна біологія» та «Батрахологія та герпетологія». Зібрані матеріали зберігаються в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна, а через повномасштабну війну дисертацію було продовжено в Інституті фізіології та генетики тварин у Лібехові, Чеська Республіка, за підтримки гранту № RRFU-22-21 від Чеської Академії наук (CAS) (під керівництвом д-ра Дідуха та д-ра Холеви).

2. The dissertation focuses on hybrid male *Pelophylax esculentus* gametogenesis in Siverskyi-Donets Center of Water Frog Diversity. Karyotypes and genomes of diploid males from four HPSs were analyzed. The study established gametogenic pathways in hybrid males, assessing their role in maintaining hemiclinal population systems at Lower Dobrytskyi pond, Koriakiv pond, Iskiv pond, and Mozh River floodplains. The author collected samples from 762 water frogs (*Pelophylax* genus) in 2016-2022 for taxonomic analysis. Morphological features were used for classification. Ploidy determination involved erythrocyte cytometry, confirmed by Ag- and DAPI-staining of chromosomes and sperm cytometry. Karyotyping utilized FISH and, in some cases, CGH for confirmation. In the four localities, both *P. ridibundus* and *P. esculentus* (di- and triploid) inhabit, categorizing these HPSs as R-E-Ep-HPS. To comprehend successful hybrid reproduction, 52 *P. esculentus* adult males were randomly selected from different ponds. Gametogenesis was examined in their spermatocytes and spermatids using FISH with Ples289 and RrS1 probes. Among 52 diploid hybrid males, 5 exclusively exhibited gametes with *P. lessonae* genome, 13 had *P. ridibundus* genome, and 29 were amphigametic. Eight males showed diploid spermatocytes and single diploid spermatids. Despite prevalent R genome transmission by hybrids, a substantial number of hybrids and single *P. ridibundus* adults occur annually in these HPSs. Contrary to expectations, 60% of analyzed cells

exhibited R genome, challenging the prevailing understanding of hybrid gamete production. FISH results revealed chromosome pairing between *P. lessonae* and *P. ridibundus* in bivalents during meiotic metaphases in five of 52 males. Three individuals showed amphigametic spermatids with both genomes. One male exhibited spermatocytes and spermatids with the *P. ridibundus* genome and a few with the RR genome. Comparative Genomic Hybridization (CGH) confirmed this unusual pairing. Two control males producing a single gamete type validated CGH results. For two males with different species chromosomes, CGH showed evidence of successful recombination. In two males, chromosomes unstained with *P. lessonae* or *P. ridibundus* genomes suggested involvement of an unidentified water frog species, potentially contributing to hybridization. The study identified six gametogenesis modes in hybrid males of *P. esculentus*: 1. Haploid gametes with *P. lessonae* genome (L). 2. Haploid gametes with *P. ridibundus* genome (R). 3. Hybrid amphigameticity: a mix of haploid gametes with L and R genomes. 4. Diploid gametes with RR, LL, and LR genome compositions. 5. Aneuploid gametes with non-multiple-of-13 chromosomes, both with L and R genomes. 6. Gametes with a mix of two or three genomes, potentially involving recombination and introgression from another water frog species. The study concludes that the 14% presence of aneuploid cells in analyzed spermatocytes and spermatids indicates imperfections in the regulation of elimination and endoreplication in germ cells of interspecies hybrids, consistent with contemporary studies on genome elimination in water frog hybrids. Aneuploidy is seen because of selective premeiotic elimination of one of the genomes. While mechanisms governing genome elimination in water frogs are not extensively studied, insights from hybrid plant elimination mechanisms suggest that differences in centromeric repeat copies in parental species' genomes may lead to misalignment and lagging of *P. lessonae* chromosomes during gonocyte multiplication. Consequently, in hybrids, *P. ridibundus* chromosomes may have a higher likelihood of attaching to kinetochores during gonocyte division, contributing to their more successful clonal transfer to gametes. These findings provide crucial insights into male water frog gametogenesis, including amphigameticity and recombination. The research significantly advances our understanding of mechanisms overcoming reproductive barriers in interspecies hybrids, with practical implications for biodiversity preservation and future bioindicative studies. The study materials are valuable for courses like "Zoology of Vertebrate Animals," "Cytology and Cell Biology," and "Batrachology and Herpetology." Collected materials are stored at V. N. Karazin Kharkiv National University, and due to a full-scale invasion, the dissertation continued at the Institute of Animal Physiology and Genetics in Libechov, Czech Republic, supported by grant No. RRFU-22-21 from the Czech Academy of Sciences (CAS) (under supervision of Dr. Didukh and Dr. Choleva).

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки: Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності: Не застосовується

Підсумки дослідження: Теоретичне узагальнення і вирішення важливої наукової проблеми

Публікації:

- 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>.
- 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>.
- 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>.

- Pustovalova E., Fedorova A., Shabanov D. Methodology for intravital mitotic chromosome preparation from regenerated tissue derived from the tail tips of tadpoles. Journal of Vertebrate Biology. 2022. No. 71(22010), 22010. P. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.25225/jvb.22010> (Scopus, Web of Science, Q2, IF=1.46).
- Fedorova A., Pustovalova E., Drohvalenko M. High frequency of hindlimb malformation in froglets Pelophylax sp. in Ukraine. Herpetol. Bull. 2023. No. 164. P. 24-25. DOI: <https://doi.org/10.33256/hb164.2425> (Scopus, Q3, IF=0.238).

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації: Впровадження не планується

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Шабанов Дмитро Андрійович
2. Dmytro Shabanov

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.16

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0003-3247-6882

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Код за ЄДРПОУ: 02071205

Місцезнаходження: майдан Свободи, буд. 4, Харків, Харківський р-н., 61022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Сурядна Наталія Миколаївна
2. Nataliia Suriadna

Кваліфікація: к. б. н., доц., 03.00.08

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-0681-4465

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Відокремлений структурний підрозділ закладу вищої освіти "Відкритий міжнародний університет розвитку людини "Україна" Мелітопольський інститут екології та соціальних технологій

Код за ЄДРПОУ: 25763609

Місцезнаходження: вул. Хорива, 1 Г, Київ, 04071, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Струс Василина Орестівна

2. Vasylyna Strus

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.08

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0003-1126-7109

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Львівський національний університет імені Івана Франка

Код за ЄДРПОУ: 02070987

Місцезнаходження: вул. Університетська, буд. 1, Львів, 79000, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Єрмоленко Сергій Вадимович

2. Yermolenko Serhii V.

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.16

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57220009299>;[https://www.webofscience.com/wos/author/record/C-3859-](https://www.webofscience.com/wos/author/record/C-3859-2018)

<https://scholar.google.com.ua/citations?user=qvgR0okAAAAJ&hl=uk>;<https://www.researchgate.net/profile/Serhii-Yermolenko>

Повне найменування юридичної особи: Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара

Код за ЄДРПОУ: 02066747

Місцезнаходження: проспект Науки, буд. 72, Дніпро, Дніпровський р-н., 49045, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Навроцька Валерія Володимирівна
2. Valeriya Navrotska

Кваліфікація: к. б. н., доц., 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-6523-9456

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Код за ЄДРПОУ: 02071205

Місцезнаходження: майдан Свободи, буд. 4, Харків, Харківський р-н., 61022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

VIII. Заключні відомості

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
голови ради**

Страшнюк Володимир Юрійович

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
головуючого на засіданні**

Страшнюк Володимир Юрійович

**Відповідальний за підготовку
облікових документів**

Шевченко Андрій Олександрович

Реєстратор

УкрІНТЕІ

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є
відповідальним за реєстрацію наукової
діяльності**



Юрченко Тетяна Анатоліївна