

## ВІДГУК

Офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора, завідувача кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики Одеського національного університету імені І.І. Мечникова на кваліфікаційне дослідження «*5S рибосомна ДНК та гени CO1-CO2 як молекулярні маркери в оцінці генетичного різноманіття комах*» Рошки Надії Михайлівни, яка здобуває науковий ступінь доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

**Актуальність теми дослідження.** Дисертаційна робота Рошки Надії Михайлівни присвячена вивченню аналізу молекулярної організації, еволюції та використання 5S рДНК та генів *CO1-CO2* в якості маркерних ділянок в оцінці генетичного різноманіття представників різних груп комах.

Актуальність обраної тематики зумовлена розвитком сучасних молекулярно-генетичних методів досліджень та наявністю великої кількості все ще невирішених питань. Зокрема, складним є питання прояснення філогенетичних відносин для багатьох таксонів низького рангу у комах та їх видова ідентифікація. Для коректної ідентифікації видів, які неможливо розмежувати за допомогою морфологічних параметрів, єдиним надійним інструментом можуть слугувати молекулярно-генетичні методи, які базуються на порівнянні особливостей структури ДНК.

Отже, використання окремих ділянок геному в якості молекулярних маркерів дозволяє якісно встановлювати філогенетичні зв'язки у різних групах організмів, ідентифікувати нові види, здійснювати оцінку біорізноманіття та моніторингу динаміки популяцій. Для комах такі дослідження становлять практичний інтерес, оскільки велика кількість представників цієї групи є шкідниками сільськогосподарських культур.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, темами.**

Дисертаційне дослідження Рошки Надії Михайлівни виконане на базі кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича та повністю відповідає науковій тематиці кафедри в рамках кафедральної теми: «Структурно-функціональна організація геному та механізми адаптації у еукаріот» (2021-2025; номер державної реєстрації 0121U111109) та держбюджетної теми «Генетичний поліморфізм, розповсюдженість та адаптаційні здатності українських порід медоносної бджоли» (2020-2022; номер державної реєстрації 0120U102119).

Нові факти, отримані здобувачем та їх **наукова новизна** полягають в тому, що:

1. Вперше клоновано та секвеновано гени *CO1-CO2* та повторювані ділянки 5S рДНК для різних підвидів медоносної бджоли *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae.
2. Вперше описано хромосомну локалізацію кластерів 5S рДНК у медоносних бджіл, метеликів та плодових мушок, виявлено новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів.
3. Детально описано та проаналізовано молекулярну організацію, поліморфізм та характер мінливості 5S рДНК у досліджуваних видів.
4. Встановлено суттєві відмінності в молекулярній організації та швидкості еволюції 5S рДНК у різних групах комах.
5. Проведено порівняльну оцінку можливостей застосування різних молекулярних маркерів, 5S рДНК та гени *CO1-CO2* для баркодингу та реконструкції філогенезу комах.

Наукова **достовірність** і **обґрунтованість** наукових результатів підтверджується наявністю публікацій у фахових наукових виданнях, які проходять рецензування. Крім того, у процесі підготовки дисертації



здобувачкою були використані різні сучасні лабораторні методи, такі як виділення геномної та плазмідної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез, а також метод клонування. Біоінформатичні методи, такі як аналіз послідовностей ДНК, робота з геномними базами даних, аналіз повногеномних архівів та різні методи філогенетичного аналізу також були використані у дослідженні.

**Оцінка змісту дисертації та її завершеність.** Дисертаційна праця Надії Михайлівни Рошки складається з наступних розділів: вступ, огляд літератури, опис використаних матеріалів та методів досліджень, представлення отриманих результатів та їх обговорення, висновки, бібліографічний список використаних джерел літератури та один додаток. У роботі міститься 11 таблиць, 26 рисунків. Бібліографічний список включає в себе 188 літературних джерел.

У **Вступі** аргументовано вибір напряму дослідження та його актуальність, сформульовано мету та завдання, подано дані про публікації результатів у наукових працях та наведено інформацію про представлення дисертації на наукових форумах. Описано наукову цінність та практичну важливість отриманих результатів. Вступ завершується оглядом структури та обсягу дисертації.

У **першому розділі**, який є оглядом літератури, розглядаються існуючі проблеми та невирішені питання в галузі систематики комах. Крім того, надається опис поширених маркерних систем, які використовуються в сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях для оцінки біорізноманіття не лише в комах, але і в еукаріотичних організмах взагалі. Одними з найінформативніших ДНК-маркерів для дослідження комах на сьогодні вважаються поліморфні локуси мітохондріальної ДНК. Однак, варто враховувати, що використання виключно мітохондріальної ДНК має свої обмеження та недоліки. Тому, окрім послідовностей мтДНК, слід також звертати увагу на маркерні гени ядерного геному, до яких відносяться гени

рибосомних РНК, зокрема 5S рДНК. Враховуючи це, головною метою дисертаційного дослідження Рошки Надії Михайлівни був аналіз варіабельності мітохондріальних генів *COI-CO2* та гену 5S рДНК в різних групах комах та здійснення оцінки можливостей використання цих ділянок геному в якості маркерних задля баркодингу та відновлення філогенетичних відносин в досліджуваних таксонах.

У **другому розділі** дисертації надається огляд матеріалів та методів дослідження. Для досягнення поставленої в попередньому розділі мети було використано сучасні лабораторні методи, вже згадані раніше.

У **третьому розділі**, який є розділом результатів та їх обговоренням, розкривається науковий інноваційний внесок дисертаційного дослідження на основі отриманих результатів. Дисертанткою було виявлено наявність специфічних одиночних нуклеотидних поліморфізмів (SNP) в мітохондріальних генах *COI* і *CO2*, які характерні для різних підвидів бджіл. Отримані результати свідчать про можливість використання генів *COI* і *CO2* для ідентифікації видів або порід медоносної бджоли, включаючи українські аборигенні породи.

Крім того, було встановлено, що підвиди *A. mellifera* відрізняються за наявністю різних структурних варіантів IGS S-типу у своїх геномах. Це вказує на можливість використання цих структурних варіантів як молекулярних маркерів для ідентифікації підвидів або порід бджіл.

У досліджених представників ряду Лускокрилих аналіз послідовності гена *COI* надав можливість визначити видову належність та розглянути їх філогенетичне положення. Аналіз 5S рДНК виявив значний внутрішньогеномний поліморфізм для цієї послідовності в метеликів. Для досліджуваних видів були ідентифіковані різні риботици, які умовно були розділені на довгі та короткі варіанти. Аналіз кодувальних ділянок показав, що в геномі метеликів присутні не лише функціональні повтори 5S рДНК, але й можливі псевдогени. На загал здобувачкою було встановлено, що в досліджених видів Лускокрилих поліморфізм за послідовністю гена *COI* є



значно меншим у порівнянні з генами 5S рДНК. Отримані результати свідчать про різні темпи еволюції аналізованих ділянок.

Також в третьому розділі дисертації здобувачка докладно описує молекулярну організацію та поліморфізм генів *CO1-CO2* мтДНК і 5S рДНК у деяких представників родини Tephritidae (Diptera). Аналіз генів *CO1* та *CO1-CO2* показав, що ці ділянки можуть використовуватись для ідентифікації видів мушок цієї родини. Окрім того, було продемонстровано різницю у варіабельності ділянок *CO1-CO2* мтДНК та гена *CO1*. Поряд з цим, дослідження молекулярної організації 5S рДНК мушок вказує, що варіанти IGS, які присутні у геномах представників підродини Tephritinae, можуть бути представлені одним або кількома структурними класами.

Загалом, у дисертаційній роботі Рошки Надії Михайлівни вперше досліджено організацію та поліморфізм генів *CO1-CO2* та 5S рДНК для різних підвидів медоносною бджолою *Apis mellifera*, метеликів родини Drepanidae та плодкових мушок родини Tephritidae. Здобувачкою також було вперше описано хромосомну локалізацію генів 5S рДНК, виявлений новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів. Отже підтверджено, що ген 5S рДНК може бути використаний як молекулярний маркер для ідентифікації таксонів низького рівня.

У **висновках** до роботи узагальнені основні результати дисертаційного дослідження, які повністю відповідають меті та поставленим завданням. Вони мають загальний характер і відзначають наукову новизну отриманих результатів.

**Відсутність порушення академічної доброчесності.** Дисертаційна робота Рошки Надії Михайлівни представляє собою самостійно виконану та завершену наукову працю, а основні результати, нові наукові положення та висновки опубліковані в наукових працях, пов'язаних із темою дисертації. Немає жодних виявлених порушень академічної доброчесності.

**Дискусійні положення та побажання щодо вдосконалення змісту дисертації.** При ознайомленні з дисертаційною роботою Рошки Н.М. виникли окремі питання та зауваження:

В розділі «Матеріали і методи». Для деяких видів, вказаних в таблиці 2.1, не наведено їх походження. Бажано б було це вказати.

В розділі «Матеріали і методи». Автор наводить три праймери до 5S рДНК - RV0803, RV0804, RV1406, але не дає пояснення - яким чином саме ці праймери гібридизуються з нуклеотидними послідовностями 5S рДНК. Відсутність цієї інформації ускладнює розуміння виявленого автором поліморфізму за IGS-S і IGS-L і в цілому за 5S рДНК.

Данні представлені в таблиці 3.11. викликають питання - за рахунок чого варіює послідовність IGS-S типу 5S рДНК і чому різні структурні варіанти, наприклад, *A2a* і *Alj*, мають однакову довжину у 237 п.н. та характеризуються різним вмістом GC пар, 22,8 і 21,9%, відповідно. В цей же час, у *A. m. macedonica* Mcd 1-4 *A2a* має довжину 237 п.н., а GC склад - 23,2 %, тоді як у *A. m. mellifera* Mell-11 *A2a* має довжину 237 п.н., а GC склад 22,8 %. Таким чином, запропонована автором класифікація типів варіантів IGS-S типу 5S рДНК потребує додаткового роз'яснення.

Є питання до підрозділу 3.1.2.5. «Поліморфізм IGS S-типу у різних підвидів *A. mellifera*», в якому наводиться таблиця Таблиця 3.1.5 «Довжини ПЛР-фрагментів (нп) 5S рДНК *Apis mellifera* після обробки рестриктазами», в якій представлені ті самі структурні варіанти *Ala* і *Alj*, але характеризуються вони вже іншими за довжиною фрагментами 392 і 378 п.н. Бажано, щоб авторка надала пояснення з цього приводу. Також потребує пояснення, чому є розходження в назві підрозділу та єдиної таблиці, яка є в цьому підрозділі?

Потребує пояснення рис. 3.1.6. «Електрофоретичний аналіз фрагментів ДНК, отриманих внаслідок обробки ПЛР-ампліфікатів IGS ендонуклеазами рестрикції *AseI* (А), *DraI* (Б) та *SspI* (В)....». Виникає питання: чи наведено фрагменти рестрикції, які отримані виключно з IGS або також з фрагментами кодувальної ділянки 5S рДНК *Apis mellifera* після обробки рестриктазами?



Хотілося би запитати автора, скільки риботипів в середньому виявляли в геномі однієї бджоли?

Яка варіація за риботипами спостерігається в межах породи /лінії за представленістю різних біотипів у різних особин?

З огляду на те, що автор співпрацювала з селекціонерами, які займаються селекцією бджіл, виникає питання - чи спостерігається кодомінування за риботипами в F1 у бджіл? Чи спостерігається розщеплення за риботипами в F2?

### **Загальний висновок.**

Не зважаючи на поставлені питання та зроблені зауваження вважаю, що представлена до захисту дисертаційна робота Рошки Н.М. є оригінальним науковим дослідженням, що, як зазначалося вище, суттєво розширює наші уявлення про генетичний поліморфізм генів *CO1-CO2* та повторювані ділянки 5S рДНК для різних підвидів медоносної бджоли *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae та надає уявлення про можливості застосування різних молекулярних маркерів, зокрема, 5S рДНК та генів *CO1-CO2* для баркодингу та реконструкції філогенезу комах. Данні отриманні і представлені Рошкою Н.М. в дисертаційній роботі надають обґрунтовану інформацію щодо хромосомної локалізації кластерів 5S рДНК у медоносних бджіл, метеликів та плодових мушок й нового типу диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів, а також детальну інформацію про молекулярну організацію, поліморфізм та характер мінливості 5S рДНК у досліджених видів.

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до дисертацій.**

Дисертаційна робота Рошки Надії Михайлівни «5S рибосомна ДНК та гени *CO1-CO2* як молекулярні маркери в оцінці генетичного різноманіття комах» є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю

відповідає вимогам до 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» прийнятій 12.01.2022р №44, а її автор, Рошка Надія Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Завідувач кафедри,  
молекулярної біології, біохімії та генетики  
Одеського національного університету  
імені І.І. Мечникова,  
член-кор. НААН, проф., с.н.с., д.б.н.



С. В. Чеботар

