

## ВІДГУК

Офіційного опонента – доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника Пірка Ярослава Васильовича, ученого секретаря ДУ «ІХБГ НАН України» 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 виконаної роботи.**

Вивчення систематики комах раніше проводились здебільшого з використанням традиційних морфолого-анатомічних методів. Проте, велика кількість питань все ще залишаються відкритими. Зокрема, не до кінця з'ясованими залишаються філогенетичні відносини для чисельних груп комах низького рангу та їх коректна видова та внутрішньовидова ідентифікація. Значною мірою це пов'язано з неузгодженістю у таксономічних поглядах між окремими дослідниками, що викликає необхідність залучення більш точних та об'єктивних підходів для такого типу досліджень. Так, задля коректної ідентифікації видів, які неможливо розмежувати за допомогою морфологічних параметрів (види-двійники/види-близнюки, криптичні види), єдиним надійним інструментарієм можуть слугувати молекулярно-генетичні методи, які базуються на порівнянні особливостей структури ДНК.

Окремі ділянки геному в наш час широко використовуються як молекулярні маркери для встановлення філогенетичних зв'язків різних груп організмів, ідентифікації видів, оцінки біорізноманіття та моніторингу динаміки популяцій. Для комах це можуть бути ділянки ядерного (5S рДНК) та мітохондріального (*CO1-CO2*) геномів. Такі дослідження для комах становлять практичний інтерес, оскільки велика кількість представників цієї групи є шкідниками сільськогосподарських культур.

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

Тематика дисертаційної роботи повністю відповідає науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету 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).

### **Новизна наукових результатів** висвітлена в наступних положеннях:

1. Вперше клоновано та сиквеновано 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 *COI-CO2* для баркодингу та реконструкції філогенезу комах.

**Обґрунтованість та достовірність** наукових результатів забезпечується наявними публікаціями, які рецензуються фаховими науковцями. Окрім того, у процесі підготовки дисертації здобувачка використала різні сучасні лабораторні методи дослідження, зокрема виділення геномної та плазмідної ДНК, полімеразну ланцюгову реакцію, електрофоретичний аналіз, метод клонування. Також були використані біоінформатичні методи, зокрема: аналіз сиквенованих послідовностей ДНК, робота з геномними базами даних, аналіз повногеномних архівів, різні методи вирівнювання та побудови філогенетичних дендрограм. Значна частина досліджень була автоматизована та виконувалася за допомогою комп'ютерних програм, що дозволило виключити ймовірну похибку експериментатора та підвищити точність одержаних результатів. Основні положення дисертації, її висновки та рекомендації є обґрунтованими та достовірними, базуються на достатньому обсязі отриманого матеріалу.

#### **Оцінка змісту дисертації та її завершеність.**

Дисертаційну роботу викладено на 158 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису використаних матеріалів та методів досліджень, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Робота містить 11 таблиць, 26 рисунків та додаток. Бібліографічний список складається з 188 літературних джерел.

У *Вступі* обґрунтовано вибір теми та її актуальність, зформульованні мета та завдання дослідження, наведені дані про оприлюднення результатів у наукових працях та апробацію дисертації на наукових форумах. Охарактеризовані наукова новизна та практична цінність отриманих результатів. Завершується вступ інформацією про структуру та обсяг дисертації.

*Перший розділ*, огляд літератури, у якому висвітлюються існуючі проблеми та невирішені питання в систематиці комах. Також у цьому розділі охарактеризовано поширені маркерні системи, які застосовуються в сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях для оцінки біорізноманіття (ДНК-баркодингу) не лише комах, а й загалом еукаріот. Одними з найінформативніших ДНК-маркерів для комах на сьогоднішній день вважаються поліморфні локуси мітохондріальної ДНК. Однак використання

лише мітогену має свої певні обмеження та недоліки. Зважаючи на це, крім послідовностей мтДНК, необхідно залучати й маркерні гени ядерного геному, до яких належать гени рибосомних РНК, а саме 5S рДНК. Проте, для комах потенціал використання 5S рДНК в якості молекулярного маркеру все ще залишається недостатньо вивченим. З огляду на це, метою дисертаційного дослідження було проаналізувати мінливість мітохондріальних генів *CO1-CO2* та ядерної 5S рДНК у різних групах комах та оцінити можливості використання цих ділянок геному в якості молекулярних маркерів для баркодингу та реконструкції філогенетичних відносин у досліджуваних таксонах.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Ампліфікувати, клонувати та сиквенувати послідовності генів *CO1-CO2* та 5S рДНК представників різних таксономічних груп комах.
2. Проаналізувати банк нуклеотидних послідовностей (GenBank) на наявність сиквенованих ділянок *CO1-CO2* та 5S рДНК досліджуваних та близькоспоріднених видів.
3. Дослідити молекулярну організацію обраних для аналізу ділянок геному та оцінити їх поліморфізм
4. За допомогою отриманих даних зробити висновок про можливість використання ділянок *CO1-CO2* та 5S рДНК в оцінці генетичного різноманіття комах.

*Об'єкт дослідження* – генетичний поліморфізм та еволюція геномів еукаріот.

*Предмет* – 5S рибосомна ДНК та гени цитохромоксидази *CO1* та *CO2*.

У другому розділі наводяться *Матеріали та методи дослідження*. У дисертаційній роботі було використано сучасні лабораторні методи дослідження, зокрема: виділення геномної та плазмідної ДНК, квантифікація ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофоретичний аналіз, створення рекомбінантних конструктів та клонування фрагментів ДНК, сиквенування ДНК. Також були використані біоінформатичні методи: аналіз сиквенованих послідовностей ДНК, скринінг геномних баз даних, аналіз повногеномних архівів, вирівнювання послідовностей ДНК та побудова філогенетичних дендрограм.

*Третій розділ* – результати та їх обговорення, розкривають наукову новизну дисертаційного дослідження на основі отриманих результатів. Автором встановлено присутність в мітогеномах досліджуваних бджіл специфічних SNP, характерних для того чи іншого підвиду. Отримані результати свідчать, що гени *CO1* та *CO2* можуть бути використані для ідентифікації видів/порід медоносної бджоли, зокрема – українських аборигенних порід. Також встановлено, що підвиди *A. mellifera* різняться за набором структурних варіантів IGS S-типу, які присутні у їх геномах, що дозволяє використовувати ці набори як молекулярні маркери для ідентифікації підвидів/порід. У досліджених представників ряду Лускокрилих аналіз послідовності гена *CO1* дозволяє встановлювати видову приналежність та з'ясувати їх філогенетичне положення. В окремих випадках використання цього молекулярного маркеру дозволяє виявляти генетичну різницю між

популяціями в межах одного виду. Аналіз 5S рДНК виявив суттєвий внутрішньогеномний поліморфізм цієї ділянки у метеликів. Для досліджуваних видів ідентифіковано різні риботики, які умовно було поділено на довгі та короткі. В геномах метеликів родини Drepanidae кластери 5S рДНК знаходяться на кількох хромосомах та містять як архаїчні предкові, так і похідні від них еволюційно молоді риботики. Аналіз CDS показав, що в геномі метеликів присутні не тільки функціональні повтори 5S рДНК, але й ймовірні псевдогени.

Встановлено, що у досліджених видів Лускокрилих поліморфізм за послідовністю CO1 мтДНК є суттєво нижчим порівняно з генами 5S рРНК, що свідчить про різний темп еволюції цих ділянок.

Також у третьому розділі автором описана молекулярна організація та поліморфізм генів CO1-CO2 мтДНК та 5S рДНК деяких представників родини Tephritidae (Diptera). Проведений аналіз генів CO1 та CO1-CO2 показав, що ці ділянки можуть використовуватись для ідентифікації видів мушок-тефритід. При цьому роздільна здатність ділянки CO1-CO2 мтДНК дещо менша, ніж послідовності гена CO1. Дослідження молекулярної організації 5S рДНК свідчать, що риботики IGS, які присутні у геномах представників підродини Tephritinae, можуть бути представлені одним або кількома структурними класами.

В цілому у дисертаційній роботі вперше досліджено організацію та поліморфізм генів CO1-CO2 та 5S рДНК для різних підвидів медоносною бджолою *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae. Вперше описано хромосомну локалізацію кластерів 5S рДНК, виявлено новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів. Встановлено, що 5S рДНК може використовуватись як молекулярний маркер для ідентифікації таксонів низького рівня.

У **висновках** здобувачем представлено основні результати дисертаційного дослідження, які цілком відповідають меті роботи і поставленим завданням, мають узагальнюючий характер і містять наукову новизну.

#### **Відсутність порушення академічної доброчесності.**

Дисертаційна робота Рошки Надії Михайлівни є самостійно виконаною та завершеною науковою працею. Основні результати, нові наукові положення та висновки, сформульовані у дисертації, опубліковані в наукових працях, зарахованих за темою дисертації, в роботі порушення академічної доброчесності не виявлено.

**Але під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли такі запитання та зауваження:**

1. Чому саме з усіх генів ядерного геному для вивчення питань філогенії були використані гени 5S р ДНК?
2. Чому автор не використовував для філогенетичного аналізу мікросателітну ДНК (ISSR – маркери)?

3. У літературному огляді бажано було б схематично відобразити структуру генних кластерів, що кодують 5 S рДНК.
4. В роботі дуже часто зустрічається словосполучення «нами було проведено». Краще замінити на просто «було проведено», не акцентуючи увагу на колективному характері виконаної роботи.
5. В роботі присутні орфографічні помилки.

Проте наведені питання та зауваження не мають критично важливого значення і не зменшують наукову цінність дисертаційної роботи.

**Висновок стосовно дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота Рошки Надії Михайлівни «5S рибосомна ДНК та гени *COI-CO2* як молекулярні маркери в оцінці генетичного різноманіття комах» є завершеною науковою працею. Тема дисертації є актуальною, сформульовані у дисертації положення становлять вагомий внесок у подальший розвиток біологічної науки.

На основі результатів аналізу представленої роботи можна зробити висновок, що за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, науковою новизною, достовірністю одержаних результатів, обґрунтованістю висновків, стилем оформлення роботи, дисертація Рошки Надії Михайлівни «5S рибосомна ДНК та гени *COI-CO2* як молекулярні маркери в оцінці генетичного різноманіття комах» відповідає вимогам пп. 14, 15, 16 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а її автор Рошка Надія Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня «доктор філософії» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

учений секретар Державної установи

«Інститут харчової біотехнології та геноміки

Національної академії наук України»

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник



Ярослав ПІРКО

03.11.2023