

Голові разової спеціалізованої
вченої ради Харківського
національного університету
імені В. Н. Каразіна
професору Володимиру
СТРАШНЮКУ
майдан Свободи 4,
м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного рецензента, доцента кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кандидата біологічних наук (спеціальність 03.00.15 – генетика) Навроцької Валерії Володимирівни на дисертаційну роботу Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія» з галузі знань 09 – «Біологія».

Обґрунтування вибору теми дослідження

Міжвидова гібридизація може порушувати консервативні шляхи гаметогенезу, утворення пар між хромосомами і рекомбінацію в мейозі, наслідком чого може бути стерильність гібрида. Втім, відомо, що гібриди можуть долати стерильність завдяки роботі різноманітних цитогенетичних механізмів (наприклад, поліплоїдизації). У багатьох випадках спостерігаються премейотичні або мейотичні зміни у шляхах гаметогенезу, що призводить до утворення клональних гамет. Особливості процесу утворення гамет у гібридів, як і механізми збереження клональних ліній у популяціях та їх вплив на батьківські види, вивчені недостатньо.

Зелені жаби *Pelophylax esculentus* complex мають особливу систему відтворення і є чудовою групою для дослідження міжвидових гібридів. Диплоїдні гібриди, *P. esculentus*, виникли від схрещування *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Під час гібридного гаметогенезу один з батьківських геномів вибірково елімінується, тоді як інший дублюється та клонально передається в гамети. Додаткові зміни в гаметогенезі можуть призвести до утворення диплоїдних гамет, які після запліднення призводять до появи поліплоїдного потомства. Гібриди зазвичай співіснують і розмножуються з одним з батьківських видів, утворюючи геміклональні популяційні системи з різним співвідношенням батьківських видів і гібридних форм.

Дисертація Пустовалової Е. С. зосереджена на аналізі сперматогенезу у гібридних самців і оцінці їх внеску у відтворення гібридів у різних геміклональних популяційних системах Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Використовуючи сучасні методи цитогенетики, Пустовалова Е. С. визначила склад геному сперматоцитів та сперматид у дорослих диплоїдних гібридних самців. Ці результати детально описують шляхи гаметогенезу гібридних самців *P. esculentus*, а також розкривають роль таких самців у механізмах підтримання гібридного відтворення у геміклональних популяційних системах.

Зважаючи на вищезазначене, можна стверджувати, що дисертація Пустовалової Елеонори Сергіївни є повністю актуальною, а її результати є важливими для розуміння механізмів, які забезпечують елімінацію геному в гібридів.

Загальна характеристика дисертаційної роботи

Дисертаційна робота виконана переважно в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна та частково на базі Лабораторії генетики риб Інституту фізіології та генетики тварин (Лібехов, Чеська Республіка). Дисертаційна робота складається з анотацій українською та англійською мовами,

вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів у вигляді 2 розділів (4 та 8 підрозділів відповідно), обговорення результатів (4 розділи, 1 із яких містить 3 підрозділи), висновків та списку використаної літератури, який містить 309 найменувань, додатків. Загальний обсяг роботи складає 253 сторінки. Робота ілюстрована 22 рисунками та 4 таблицями.

У вступі наведено обґрунтування вибору теми, визначено мету й завдання дослідження, методи дослідження, розкрито наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, зазначено особистий внесок здобувачки при виконанні дослідження, наведено інформацію щодо наукових публікацій за темою дисертації та апробації матеріалів дисертації, встановлено зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

У розділі «Огляд літератури» проведено літературний аналіз, присвячений огляду теоретичних та експериментальних напрацювань стосовно відтворення гібридів зелених жаб у геміклональних популяційних системах, у тому числі детальному аналізу їх гаметогенезу. При написанні використано відповідні темі наукові джерела, більшість з яких – це оригінальні сучасні статті, що відповідає вимогам до оформлення дисертації.

У розділі «Матеріали та методи» дисертації наведено повний та детальний опис кожної з використаних методик (час, реактиви, умови перебігу реакцій, обладнання) та чітко зазначено, скільки тварин було використано в ході кожного з експериментів.

У розділі «Результати» отримані дані представлені у вигляді двох підрозділів. Перший з них складається з чотирьох частин, кожна з яких присвячена складу геміклональних популяційних систем. Наведені дані, які були зібрані протягом декількох років, опрацьовані різноманітними цитологічними та морфологічними методами. Другий підрозділ складається з восьми частин, кожна з яких присвячена аналізу гаметогенезу гібридних самців в зелених жаб із застосуванням надточних цитогенетичних методів (FISH, CGH, Ag- та DAPI-

фарбування). Усі розрахункові дані, а також фото хромосом високої якості наявні у цьому розділі або винесені у Додатки.

У розділі «Обговорення» представлено повне і докладне пояснення та обґрунтування результатів дисертаційної роботи. Знайдено відмінності у гаметогенезі самців з різних локалітетів, отримані результати порівнюються у контексті геміклональних популяційних систем різного типу, а також з наявними сучасними літературними даними. Додатково наводяться детальний опис внеску гібридних самців у відтворення гібридів у геміклональних популяційних системах, а також шляхи їх гаметогенезу.

У висновках стисло наведено основні результати, які повністю відповідають змісту роботи. Список використаних джерел містить посилання на відповідні літературні та власні публікації за темою дисертації. Кожен з розділів завершується логічним висновком, який підсумовує основні положення. Усе це вказує на завершеність та цілісність проведених досліджень.

Наукова новизна полягає у таких основних результатах:

1. Уперше проаналізовано і описано детальні шляхи гаметогенезу у диплоїдних гібридних самців із застосуванням цитогенетичних маркерів.

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

3. За результатами досліджень, кожен з чотирьох локалітетів населяють особини *P. ridibundus* та *P. esculentus* (ди- та триплоїдні), які утворюють ГПС R–E–Er–типу.

4. Виявлено, що, попри переважну передачу гібридами в досліджуваних ГПС геномів R, в цих ГПС щороку спостерігається велика частка гібридів і наявність лише одиничних дорослих особин *P. ridibundus*.

5. Уперше, з використанням FISH з видоспецифічними до перичентромерних ділянок хромосом зондами показано наявність самців, які

мали у сім'яниках сперматоцити та сперматида виключно з геномом *P. lessonae* або *P. ridibundus*, а також таких особин, які були амфігаметними (в одних сперматоцитах та сперматидях мали геном *P. lessonae*, а в інших – геном *P. ridibundus*).

б. Додатково зареєстровано самців, які демонстрували явище аномальної кон'югації хромосом різних видів у біваленти, а також тих самців, які продукували диплоїдні сперматоцити та поодинокі диплоїдні сперматида.

Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Аналіз тексту дисертації та змісту публікацій Пустовалової Е. С. дає змогу зробити висновок, що результати є науково обґрунтованими, достовірними та відповідають меті й завданням дисертаційної роботи. Достовірність та обґрунтованість наукових результатів і висновків дисертаційної роботи не викликає жодних сумнівів і забезпечується високим рівнем апробації та наукових видань, у яких опубліковано результати дослідження.

Апробація та публікації

Основні результати роботи оприлюднені у вигляді 9 тез та обговорені на 5 конференціях: “Ukrainian fauna on the verge of the XX-XXI centuries. Status and biodiversity of the ecosystems of protected areas”, International Zoological Conference, September 2019, 2021, Lviv, Shatsk, Ukraine; 14th International young scientists’ conference “Biology: From a Molecule Up to The Biosphere”, November 27–29, 2019, Kharkiv, Ukraine; 24th Symposium of Biology Students in Europe, July, 2021, Portugal; The 14th European Cytogenomics Conference, Montpellier, France, 1–4 July, 2023; “Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень”, IV Міжнародна науково-практична конференція, 12–13 жовтня, 2023, смт. Путила, Чернівецька обл., Україна.

Результати дисертації повністю висвітлено в 1 науковій статті у міжнародному виданні, яке входить до міжнародних наукометричних баз Scopus

та Web of Science, 2 наукових статтях у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань України, та 4 статтях, які додатково відображають наукові результати дисертації у міжнародних виданнях, які проіндексовані Scopus, Web of Science або іншими міжнародними науковими базами.

Оформлення дисертації та академічна доброчесність

Оформлення, зміст, структура дисертації та кількість публікацій відповідають вимогам «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 12.01.2022 р. №44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. №40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

На підставі детального розгляду тексту дисертації, посилань, статей здобувача та Протоколу контролю оригінальності (перевірку можливої наявності текстових запозичень виконано в інтернет-системі Strikeplagiarism.com) встановлено, що дисертаційна робота виконана самостійно, текст дисертації не містить плагіату, а дисертація відповідає усім вимогам академічної доброчесності.

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.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності

Дисертація Е. С. Пустовалової є завершеною науково-дослідною роботою, у якій вирішено комплексну задачу, пов'язану з встановленням особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з різних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Результати досліджень повністю висвітлені в наукових публікаціях, матеріалах конференцій та відображені в змісті дисертації.

Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації

1. У розділі 3.2 при описі результатів аналізу плоідності гібридних самців з допомогою методу Ag-фарбування доцільно було б додати фото клітин з пофарбованими ядерцями та ядерцевими організаторами мітотичних хромосом.
2. Рис. 3.3 має назву “Визначення плоідності та складу геному в сперматоцитах і сперматидах самців *P. esculentus* з Іськова ставу з використанням FISH із зондом до хромосом *P. ridibundus*”, але в описі до нього згадуються і соматичні клітини, з відповідними фотографіями.
3. У кількох місцях тексту (с. 6, 157, 158, 171) при поясненні механізмів збереження чи елімінації геному одного з батьківських видів йдеться про різну здатність прикріплення хромосом до кінетохора. Оскільки кінетохор формується на центромері, більш коректним було б говорити про різну здатність центромерних ділянок хромосом різних видів прикріплювати білки кінетохору.
4. У тексті наявна незначна кількість друкарських помилок.

Наведені зауваження жодним чином не зменшують якість дисертації та обґрунтованість висновків.

Загальні висновки

Дисертація Пустовалової Елеонори Сергіївни є завершеною науково-дослідною роботою, має наукову новизну та практичне значення. Зміст повністю відображає основні наукові положення дисертації. Дисертація оформлена відповідно до чинних вимог, написана науковим стилем і літературною українською мовою.

Дисертаційна праця Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)» за актуальністю, змістом та повнотою викладення її результатів у публікаціях здобувача, обсягом і якістю оформлення відповідає спеціальності 091 – «Біологія», вимогам «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 12.01.2022 р. №44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. №40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації».

Вважаю, що Пустовалова Елеонора Сергіївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний рецензент,
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри генетики і цитології
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна

Валерія НАВРОЦЬКА

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 00:35:11 14.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук рецензента (Навроцька В.В.).docx.p7s

Розмір файлу з підписом: 36.8 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Відгук рецензента (Навроцька В.В.).docx

Розмір файлу без підпису: 18.6 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Навроцька Валерія Володимирівна

П.І.Б.: Навроцька Валерія Володимирівна

Країна: Україна

РНОКПП: 2922217707

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 08:35:00 14.01.2024

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF97040000008C033000BC2FCC01

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAAdES)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Голові разової спеціалізованої вченої ради
Харківського національного університету
імені В.Н. Каразіна професору
Володимиру СТРАШНЮКУ
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного опонента, завідуючої, доцента кафедри екології та інформаційних технологій відокремленого структурного підрозділу закладу вищої освіти «Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна» Мелітопольського інституту екології та соціальних технологій», доцента, кандидата біологічних наук Сурядної Наталії Миколаївни на дисертаційну роботу Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія з галузі знань 09 – Біологія.

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Дисертаційне дослідження Пустовалової Елеонори Сергіївни присвячене з'ясуванню шляхів гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Різні популяційні системи, в тому числі, де гібриди представлені лише самцями описані з території України майже 20 років тому, але до сих пір не з'ясовані механізми їх відтворення та підтримки життєздатності, зокрема при відсутності самиць і за наявності лише одного батьківського виду.

Гібридогенний комплекс зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) на сьогодні використовується як модельний об'єкт щодо вивчення процесів гібридогенезу, поліплоїдії, клональності та інших важливих напрямків, які відіграють важливу роль в еволюції та збереженні гібридів. Для утворення гібридогенного таксону (*Pelophylax esculentus*), необхідна участь двох батьківських видів. Але тут, окрім традиційного відтворення пов'язано з передмейотичною елімінацією одного з батьківських геномів, працюють нові механізми гаметогенезу, що призводить до утворення клональних гамет. До сих пір не в'яснено, що це за механізми, які дозволяють гібриду одночасно продукувати жіночі гамети одного батьківського виду і чоловічі – іншого.

Стратегічно важливим на сьогодні є з'ясування, які саме геноми унаслідуються, як напрацьовуються механізми, які забезпечують міжклональний характер гібридогенезу з подальшим збереженням і примноженням генетичного різноманіття складних популяцій, їх сталості та екологічної пластичності. Тому актуальність тематики дисертації Елеонори Сергіївни не викликає сумніву.

2. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому і оформлення

Загальний обсяг дисертації становить 253 сторінки друкованого тексту. Основна частина викладена на 126-ти сторінках. Дисертація складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, переліку умовних позначень, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел (309 посилань) та додатків. Робота містить 22 рисунки та 4 таблиці, 5 рисунків та 6 таблиць винесені в додатки.

У *вступі* чітко обґрунтована актуальність обраної теми дослідження, окреслені мета і задачі, коротко описані методи, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, зазначено особистий внесок, наданий перелік публікацій та апробація матеріалів дисертації, зазначається зв'язок роботи з науковими програмами, темами, грантами, описана структура та обсяг дисертації.

У *першому розділі* наведений огляд літератури. Широко аналізуються репродуктивні стратегії живих організмів. Фахово узагальнено різноманіття типів відтворення у гібридів, особливо щодо цитогенетичних механізмів, їх особливості розмноження. Аналізуються ключові механізми гібридогенезу та сперматогенезу жаб роду *Pelophylax*. Описані типи та методи вивчення популяційних систем зелених жаб. Надається історичний нарис дослідження зелених жаб на території Харківської області, заплави р. Сіверський Донець.

У *другому розділі* описаний обсяг та походження матеріалу для досліджень. Чітко окреслена та закартована територія, яка охоплює Сіверсько-Донецький центр різноманіття роду *Pelophylax*. В цілому оброблено 762 тварини дев'ятьма різними методами. Робота тривала протягом 2016–2023 рр. Детально описані методи дослідження із дотриманням відповідних заходів безпеки. Розписано методологію отримання препаратів із соматичних та зародкових тканин, Ag-зabarвлення ядерцевих організаторів мітотичних хромосом, DAPI-фарбування для визначення геному, ПЛР – методологія, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), порівняльна гібридизація геномів (CGH), отримання та обробка фотографій.

Результати дослідження представлені у *третьому розділі*. Описаний склад популяційних систем для кожного локалітету. Детально проаналізований гаметогенез диплоїдних та триплоїдних гібридних самців з використанням відповідних методів.

Четвертий розділ присвячений обговоренню результатів дослідження. Надається фахова оцінка внеску гібридних самців у підтримку та відтворення гібридів кожної дослідженої популяційної системи. Обговорено специфіку гібридогенезу гібридних самців R-E-ГПС, яка відрізняється від класичних гібридогенетичних шляхів. Показано шляхи відтворення гібридів та гаметогенезу у різних популяційних системах за рахунок різноманіття продукованих гамет, обговорені переваги і недоліки досліджуваних процесів

Висновки містять узагальнення одержаних результатів, відповідно до поставлених завдань. Розділ містить п'ять висновків, які цілісно показують

наукову новизну та вагомість результатів дослідження. Висновки сформульовано чітко, аргументовано і змістовно.

Список використаних джерел включає 309 посилань, з яких 269 у провідних іноземних виданнях. Це говорить про важливість і актуальність тематики дослідження стану проблеми на світовому рівні.

3. Найважливіші наукові результати, що містяться в дисертації

Найважливіші наукові результати, основні положення та висновки дисертаційної роботи відображені у вигляді 1 публікації в закордонному науковому виданні, проіндексованому у базах даних Web of Science та Scopus (Q1) та 2 статті у виданнях, що на момент публікації входять до переліку наукових фахових видань України. Результати, які додатково відображають наукові результати дисертації опубліковані у вигляді 2 статей в закордонних наукових виданнях. Всього наукових праць, які засвідчують апробацію та додатково відображають наукові результати матеріалів дисертації – 13. Достовірність отриманих результатів підтверджується: теоретико-методологічною обґрунтованістю вихідних положень дослідження; опрацюванням значної кількості джерел; застосуванням комплексу відповідних методів, вибір яких забезпечив достовірність і надійність отриманих результатів.

4. Наукова новизна одержаних результатів полягає у наступному.

Вперше виявлено, обґрунтовано та детально описано механізми, що забезпечують подолання репродуктивних бар'єрів у міжвидових гібридів.

Встановлені особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *P. esculentus* із модельних ГПС. Зокрема з використанням провідних методів забарвлення перичентромерних ділянок хромосом вперше для України показано наявність обох батьківських геномів у гібридів з рекомбінацією.

Вперше, на дослідженому матеріалі, продемонстровано наявність хромосом, що ймовірно належать іншому виду зелених жаб, генетичний матеріал якого бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*, демонструючи таким чином взаємну інтрогресію всіх трьох геномів.

Успішно розроблено і зареєстровано шість шляхів гаметогенезу у гібридних самців, які продукують гаплоїдні гамети з L–, або з R – геномом; продукування суміші гаплоїдних гамет, продукування диплоїдних гамет з різним складом геномів (RR, LL, LR) та продукування анеуплоїдних.

Розширено уявлення про функціонування геміклональної популяційної системи, яка представлена дорослими особинами обох статей *P. ridibundus*, диплоїдними та триплоїдними *P. esculentus* і власне саме вона населяє досліджувані біотопи.

Всі результати еволюційно значимі і свідчать про своєрідність механізмів підтримання стійкості та генетичного різноманіття популяційних систем

зелених жаб, та примноження біорізноманіття в умовах міжвидової гібридизації.

5. Практичне значення результатів дисертаційного дослідження.

Результати дисертаційного дослідження закладають еволюційнозначимі підвалини для подальшого вивчення процесів міжвидової гібридизації, яка на сьогодні все більше демонструє своє визначене місце поряд з класичними напрямками видоутворення.

Розуміння цитологічних особливостей відтворення міжвидових гібридів важливе для напрацювання стратегічних напрямків збереження популяційних систем. Розробка рекомендацій щодо особливого охоронного статусу популяційних систем зелених жаб давно назріла і потребує саме такої доказової бази їх значущості і унікальності, яка представлена в дисертації, задля комплексного збереження. Звичайно результати мусять доповнити освітньо-науковий процес і впливатись у викладання відповідних зоологічних, генетичних та екологічних дисциплін.

6. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та достовірності результатів забезпечується широким комплексним застосованих провідних методів дослідження важливих для розуміння цитологічних основ міжвидової гібридизації. Висновки та рекомендації базуються на обґрунтованій кількості обробленого матеріалу. Для обговорення та інтерпретації результатів дослідження використано достатню кількість сучасних літературних джерел.

Результати апробовані на наукових та науково-практичних конференціях, опубліковані у фахових наукових виданнях, включаючи ті, що індексуються у міжнародних наукометричних базах Scopus, Web of Science.

Представлення результатів на Європейському конгресі із цитогенетики (The 14th European Cytogenomics Conference – ECA), Монпельє, Франція (1-4 липня, 2023 р.) підсилює значимість і світовий рівень отриманих результатів. Характер статей дисертантки, в яких відображено положення дисертації і результати досліджень, повною мірою визначають дослідницьку проблему цитогенетичних особливостей гаметогенезу міжвидових гібридів.

Отже, достовірність отриманих результатів підтверджується: теоретико-методологічною обґрунтованістю вихідних положень дослідження; опрацюванням значної кількості джерел; застосуванням комплексу відповідних методів, вибір яких забезпечив високий науковий рівень і надійність отриманих результатів.

7. Дотримання академічної доброчесності та оформлення дисертації.

За результатами аналізу дисертаційної роботи та публікацій автора порушення академічної доброчесності не виявлено. Елементи фальсифікації чи

фабрикації тексту в роботі відсутні. Текст є оригінальним, посилання на першоджерела встановлено коректно. Дисертація Пустовалової Елеонори Сергіївни на тему: «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)» оформлена згідно з вимогами Наказу МОН України від 17.01.2017 року № 40.

8. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота була підтримана грантом Researchers at Risk Fellowship - UKRAINE, наданий Чеською академією наук (the Czech Academy of Sciences (CAS)) - грантом № RRFU-22-21 (01.05.2022 – 31.12.2023),

9. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації

Поважно оцінюючи наукові здобутки дисертантки, дозволимо дещо зауважити та обговорити деякі дискусійні питання.

Зауваження:

1. Важливо розуміти, що якщо види не занесені до Червоної книги України, то це не означає, що вони не підлягають охороні. Збереження типових і широко поширених видів потребує особливих підходів, оскільки саме вони забезпечують стабільне функціонування регіональних біосистем, а в умовах міжвидової гібридизації, як одного з сучасних напрямків видоутворення збереження таких видів надзвичайно важливе.
2. Дуже ретельний опис результатів основного розділу дисертації потребує короткого узагальнення у кінці розділу.
3. Підписи до рисунків дуже обширні з поясненнями. Громіздкі також назви деяких додаткових таблиць. Варто, все ж таки давати пояснення в тексті, або як примітку до таблиці.
4. Напрошується в роботі каріотипування і хоча б кілька розкладок пластинок з показовими результатами. Сама метафазна пластика не дає такого уявлення і візуалізації результатів.
5. У висновках і по тексту результати надаються у кількостях особин, що вбачається не зовсім коректним. Все ж таки бажано надавати такі результати у відсотках задля розуміння частки або внеску того чи іншого матеріалу відносно досліджуваних процесів.
6. Відмічено, що Ag-фарбування не тільки виявляє райони ядерцевих організаторів, а й надає всім хромосомами жовто-коричневий колір, що в поєднанні з барвником Гімза робить хромосоми більш чіткими. На мою думку і власний досвід, це все ж таки більше залежить від акуратності і наполегливості дослідника, що проявляється у чіткому дотриманні методів приготування і забарвлення хромосомних препаратів. Зазначу, що отримати якісні пластинки для аналізу – це велика трудомістка

робота, так само як і подальше їх фотографування, обробка та аналіз, тому робота дослідниці заслуговує неймовірної поваги.

Дискусійні питання:

1. В роботі зазначено, що остаточне визначення плоїдності особини проводили за допомогою підрахунку хромосом із соматичних клітин не менше, ніж в семи повних метафазних пластинках. Чому саме сім пластинок? Чи є обґрунтування щодо кількості пластинок, які необхідно залучити до аналізу?
2. На рисунку 3.1. представлені графіки коливання чисельності дорослих особин *P. esculentus* complex, які методи використовували для обрахунку чисельності?
3. Виявлені аномалії сім'яників стосувались лише різних розмірів, чи можливо були іще якісь інші типи порушень. І чи траплялись дорослі гібридні самці без резонаторів?
4. Цікава кількісна і якісна характеристика анеуплоїдних мітотичних пластинок. Чи прослідковується якась закономірність втрати тих чи інших гомологів або цілих пар. Якщо так, то яких хромосом, крупних чи дрібних, чи тих і тих, тощо?
5. Напрошується уточнення, скільки все ж таки у відсотках встановлено триплоїдів окремо в кожній досліджуваній популяційній системі?
6. Важливим є припущення про наявність генетичного матеріалу, зокрема хромосом іншого виду зелених жаб, який бере участь у гібридизації *P. lessonae* та *P. ridibundus*. Цікаво, що це за вид може бути?

Зазначені зауваження не є принциповими та не знижують загальний високий рівень дисертаційного дослідження

10. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи.

На підставі проведеного аналізу можна зробити висновок, що за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, теоретичною і практичною цінністю, науковою новизною, достовірністю одержаних результатів, обґрунтованістю висновків, оформленням роботи, дисертаційна робота Пустовалової Елеонори Сергіївни «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)», є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам «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 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій». Вважаю, що Пустовалова Е.С. заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 12:37:50 22.01.2024

Назва файлу з підписом: Пустовалова_Відгук.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 239.7 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Пустовалова_Відгук.pdf
Розмір файлу без підпису: 240.8 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: СУРЯДНА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА

П.І.Б.: СУРЯДНА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА

Країна: Україна

РНОКПП: 2704410940

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 12:37:50 22.01.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F0400000038DA4201AA7EC104

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2023.12.21 13:00

Голові разової спеціалізованої
вченої ради Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна
професору Володимирі СТРАШНЮКУ
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного опонента, СТРУС Василю
завідувача еколого-гідробіологічної лабораторії
Шацького біолого-географічного стаціонару
Львівського національного університету ім. І. Франка,
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.08 – зоологія

на дисертаційну роботу

Пустовалової Елеонори Сергіївни

“Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб
(*Pelophylax esculentus* complex)”

представлену на здобуття наукового ступеня
доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія
з галузі знань 09 – Біологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Робота Пустовалової Елеонори Сергіївни присвячена встановленню особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Група зелених жаб є відомим об’єктом досліджень через здатність до міжвидової гібридизації з утворенням життєздатних фертильних гібридів. Такі гібридні особини можуть співіснувати із обома батьківськими видами а також, що не менш цікаво, трапляються окремо від них. Через здатність гібридних особин до розмноження – зелені жаби є ідеальним об’єктом для дослідження еволюції виду. Тут також можна дискутувати, щодо того, що ми звикли називати “видом”. Не зважаючи на велику цікавість науковців до цієї групи, та значної кількості досліджень, ми все ж не знаємо достеменно, чому саме гібриди розмножуються? Чому вони передають клонально ту чи іншу частину геному? Як саме і коли елімінується інша частина геному? У випадку території де працювала Елеонора Сергіївна, важливим і складним запитанням є, як продовжує існувати ГПС де гібриди, здебільшого, продукують гамети батьківського виду, з яким співіснують? Тому, дослідження із використанням сучасних релевантних методів є важливим для вивчення усіх вище згаданих аспектів.

Основна увага дослідження приділяється розкриттю механізмів гаметогенезу гібридних самців, серед яких є ті, які демонструють спроможність продукувати гамети з одночасним використанням генетичного матеріалу від обох батьківських видів. Цей феномен, визначений як амфігаметність, залишається недостатньо вивченим та потребує глибшого розуміння механізмів його виникнення та функціонування. Розуміння внеску гаметогенезу гібридних особин, вплив амфігаметності, присутність триплоїдів та тетраплоїдів в ГПС може допомогти краще розуміти динаміку розвитку ГПС в різних географічних регіонах. Тому, робота Елеонори Сергіївни є актуальною, оскільки розширює наші знання про різноманіття типів гаметогенезу самців *Pelophylax esculentus* complex.

Елеонора Сергіївна працює у регіоні, де зелені жаби мають тривалу історію досліджень, проте, її дослідження є першим аналізом гаметогенезу самців *Pelophylax esculentus* complex Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Здобувачем було обрано репрезентативні модельні геміклональні популяційні системи (ГПС) *Pelophylax esculentus* complex досліджуваного центру різноманіття зелених жаб, до складу яких входять диплоїдні гібридні самці. Вона провела детальний аналіз особливостей каріотипів та видового складу геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *P. esculentus* із визначених модельних ГПС. Результатом є встановлені шляхи гаметогенезу у досліджених гібридних самців та визначено внесок таких гібридів у підтримання складу ГПС, до яких вони входять. На погляд опонента, сама задача такого дослідження є дуже цікавою і яка картина буде отримана в результаті такого дослідження, передбачити заздалегідь неможливо. Результати цієї роботи можуть бути дуже корисними для розуміння еволюції, розуміння меж "виду" та моделювання розвитку ГПС.

Наукова новизна і практична цінність дисертаційної роботи. Робота присвячена вивченню практично важливої та теоретично цікавої групи тварин в надзвичайно цікавому та унікальному регіоні поширення зелених жаб. В роботі використано широкий арсенал методів аналізу сперматогенезу на різних етапах, що раніше не використовувався для зелених жаб Сіверсько-Донецького центру різноманіття. Отримані нові дані, що стосуються етапів формування сперматозоїдів у самців гібридних особин жаби їстівної дозволяють краще зрозуміти відтворення гібридів та відкривають нові, надзвичайно цікаві факти сперматогенезу гібридів. Отримані дані є фундаментальними і пов'язані з розкриттям особливостей гаметогенезу самців зелених жаб, включаючи цитологічні аспекти амфігаметності та проявів рекомбінації. Результати досліджень роблять 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», «Батрахологія та герпетологія», тощо. Практичні результати роботи важливі для моніторингу унікальних природних систем та їх збереження. Одним з наслідків роботи стало поповнення колекційного матеріалу Лабораторії популяційної екології амфібій Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, а також Музею природи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Отримані у ході виконання роботи дані та розроблені та вдосконалені в ній методики сприяють кращому подальшому аналізу сперматогенезу зелених жаб інших типів ГПС.

Кожна така робота із використанням різноманітних методик дозволяє краще зрозуміти еволюційні процеси та, в даному випадку, цитогенетичні передумови до формування виду. Від початку і до кінця рукопису чітко зрозумілою є мета та засоби, які використані для досягнення поставлених завдань. Робота є новою, унікальною для України, і не тільки, завершеною і з правильним експериментальним дизайном.

Обґрунтованість і достовірність наукових висновків. Метою роботи є встановлення особливостей гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб. Під час роботи здобувач визначала особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *Pelophylax esculentus* із досліджених геміклональних популяційних систем (ГПС) Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб: Нижнього Добрицького ставу, Корякова ставу, Іськова ставу та заплави р. Мож. Для виконання поставлених завдань дисертант використала широкий

спектр методів, а саме Ag-, DAPI-зabarвлення хромосом на каріологічних препаратах; цитометрію сперматозоїдів на зразках, отриманих з уринальної сперми самців. Каріотипи соматичних тканин і сім'яників визначала за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), а для деяких особин підтверджувала за допомогою порівняльної геномної гібридизації (CGH). Попереднє визначення плоідності здійснено за допомогою цитометрії еритроцитів а визначення таксономічної приналежності зелених жаб Елеонора Сергіївна проводила за комплексом морфологічних ознак. Кожен етап роботи супроводжує використання коректних методів.

На підставі значного матеріалу (762 особини) проаналізувавши склад статевих продуктів самців (52) зелених жаб Сіверсько-Донецького центру різноманіття, автор з'ясовує механізми, що забезпечують розмноження гібридних самців, підтверджує попередні припущення складу ГПС досліджуваного регіону та наводить 6 шляхів гаметогенезу, які характерні для гібридних самців *P. esculentus*.

В цілому, завдання формують логічний і послідовний комплекс. У роботі використано широкий спектр методів, які дозволяють отримати достовірні дані та значущі результати їх порівняння. Зроблені в роботі висновки ґрунтуються на адекватній та достатній фактичній основі та отримані із коректним застосуванням сучасних методів аналізу даних.

Повнота викладення здобувачем основних результатів. Апробація результатів дисертаційної роботи Елеонори Сергіївни відповідає сучасним вимогам. Робота на тему «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб *Pelophylax esculentus* complex» представлена однією публікацією у 2022 році у міжнародному науковому виданні, яке входять до міжнародних наукометричних баз Scopus, Web of Science, Q1. Також є публікації у двох наукових виданнях, які включені до переліку наукових фахових видань України у 2021 році. Результати роботи було представлено на 9 конференціях починаючи з 2019 року.

Також є 4 додаткові публікації у журналах Scopus, Web of Science, Q2 та Q3 чи інших наукових баз, як профільний журнал - "Reptiles & Amphibians", які додатково представляють результати роботи здобувачки.

Оцінка мови, стилю та оформлення дисертації. Дисертаційна робота викладена на 253 сторінках з яких 145 сторінок тексту самої дисертації. Робота складається з анотації (українською та англійською мовами), змісту, 4 розділів, висновків списку літератури та додатків. Кожен розділ представлений графічним матеріалом (Розділ 1 – 2 рисунки, розділ 2 – 6 рисунків, розділ 3 – 12 рисунків та 4 таблиці, розділ 4 – 2 рисунки). Висновки складаються з 5 пунктів. Список використаних джерел демонструє коректну роботу з великим обсягом літератури (309 посилань з них 269 - латиницею). Робота містить 3 додатки, які доповнюють інформацію із основної частини (Додаток 1 – список наукових публікацій, Додаток Б – 5 додаткових рисунків, Додаток В – 6 таблиць).

Рукопис написано українською мовою, чіткою та зрозумілою. В тексті є незначні механічні помилки, які ніяким чином не впливають на зміст та розуміння роботи. Найчастіше це пропущені слова/букви, інші розділові знаки, добре було б дещо перефразувати, є декілька некоректних перекладів, часом посилання на рисунки в тексті невідповідні, в переліку умовних скорочень не усі скорочення уніфіковані (переклад на українську не всюди) та інше. Детальніше щодо кожного побажання інформація нижче:

- Сторінка 2 "762 зелених жаби", напевно, мало б бути "762 особини групи зелених жаб".
- Перелік умовних скорочень, сторінка 22 - з технічного, якщо нижче є переклад англійської назви методу на українську, то, ймовірно, було б добре уніфікувати це для усіх умовних скорочень. Також, було б добре Ples289 додати до списку умовних скорочень, за аналогією до RrS1 – *Rana ridibunda* sequence 1.

- Сторінка 51 - "... Mogošov-Leonov, 2017, 2021a, б, 2023 Dedukh, Krasikova, 2022" перед Dedukh і після 2023 бракує “;”.
- Сторінка 56 - “Вона не обов’язково вища для геномів, що передаються клонально, порівняно з гномами, що передаються статевим шляхом.”, очевидно, здобувач мала на увазі, що порівнювати необхідно із “геномами” а не “гномами”.
- Сторінка 57 - “Це відбувається через те, що елімінація геному відбувається поступово шляхом відкидання кожної з хромосом видаляемого геному (Chmielewska et al., 2018; Dedukh et al., 2020).” краще було б “ з хромосом видаляемого геному” перефразувати на “ з хромосом геному, що видаляється”.
- Сторінка 61 - “Системи R-E були знайдені та описані на території Австрії (Tunner, Herrich-Tunner, 1992), Германії (Mayer et al., 2013),...”, мабуть, мова іде про Німеччину. Аналогічне побажання на сторінці 63 рукопису, а саме: “Системи E-типу, так звані «чисті» системи, які складаються виключно з гібридів, і де масові дослідження підтвердили відсутність дорослих особин обох батьківських видів, поширені на території Данії (Rybacki, 1994; Christiansen et al., 2005; Christiansen, Reyer, 2009), Швеції (Christiansen et al., 2010; Hoffmann, Reyer, 2013), Германії (Graf, Polls-Pelaz, 1989; Berger, Berger, 1994; Pruvost et al., 2013b; Hoffmann, Reyer, 2013),...”.
- Сторінка 77 - “Рис. 1.1. Карта із субрегіонами геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex (дозвіл на використання таблиці надано одним із авторів, Шабановим Д. А., посилання – Шабанов та ін., 2017).”, напевно, мова іде про дозвіл на використання рисунка а не таблиці.
- Сторінка 87, останнє речення підпису до Рис 2.2. – “Більш детальні морфологічні відмінності надані у Рис. 2 (Атемасова та ін., 2019).” посилається здобувач, ймовірно, на Рис. 1.2.
- Сторінка 101 – “До висушеного осаду додавали воду (~50 мкл).” я так розумію, що мова іде про воду спеціально очищену для ПЛР, але, можливо, краще було б це уточнити в рукописі.
- Сторінка 106 – в тексті є посилання на Рис. 9А, але в рукописі такого рисунку нема, можливо, здобувач мала на увазі Рис. 3.1А. Аналогічне на ст. 108 – “(Рис. 9Б)” можливо мав би бути Рис. 3.1Б. Таке ж на сторінці 110 – посилання на “(Рис. 9В)” очевидно мало б бути Рис 3.1В. Аналогічне є на сторінці 112 де посилання спершу іде на “Рис. 9.” а через два рядки знову на “(Рис. 9Г)”. Таке ж на сторінці 150, є посилання на “(Рис. 9; Додаткова табл. 2)”.
- Сторінка 112 - “...одна дорослі самка *P. ridibundus* та 26 дорослих особини *P. esculentus*...”, якщо самиця була одна, тоді краще слово “доросла”.
- Сторінка 149 – “4.1.2. ГПС заплави р. Мож” текст назви підрозділу не є виділений жирним.
- Сторінка 160 – Рис. 4.2. добре було б зробити більш контрастним, оскільки не усе легко читається. Аналогічне побажання до “Додатковий рис. 3.” із сторінки 218.
- Сторінка 163 - “Такі клітини під час мейозу самців зареєстровані у великій кількості, і це призводить до зниження фертильності таких самців (Doležalková et al., 2016) Крім того,...” бракує крапки після посилання на джерело інформації, тим паче, після починається нове речення.
- Сторінка 246, Додаткова таблиця 3, для кращої орієнтації було б добре в попередній таблиці мати порядкові номери, про які тут ідеться або ж навести тут код особини та рік збору, бо важко зрозуміти, яка саме особина є 353 в Додатковій таблиці 2.
- Сторінка 251, підпис до Додаткової таблиці 6 - “Рожевий - хромосоми (біваленти або уніваленти) *P. lessonae*;...” ймовірно, здобувач мала на увазі “червоний”, оскільки рожевого кольору, який мав би відображати хромосоми жаби ставкової, в таблиці не згадується.

Аналіз змісту дисертації. Перший розділ це огляд літератури присвячений детальному аналізу доступної інформації. Здобувач розповідає про репродуктивні стратегії у живих організмів (статеве та асексуальне розмноження), різноманіття типів відтворення у гібридів, цитогенетичні механізми відтворення, особливості розмноження гібридів (елімінацію, ендореplikацію). Далі акцентує увагу на жабах роду *Pelophylax*, як модельних об'єктах вивчення гібридогенезу, сперматогенезу та диференціації гонад, на типах популяційних систем зелених жаб і методах їх вивчення, на особливостях відтворення зелених жаб, які населяють ГПС та детально подає історію дослідження зелених жаб на території Харківської області, заплави р. Сіверський Донець де Елеонора Сергіївна проводила свої дослідження. На 36-37 сторінках здобувач перераховує переваги асексуально розмноження. Як на мене, асексуальне розмноження не є надто вигідним чи, тим паче, перевагою оскільки втрачається мінливість потомства, а, отже, здебільшого, втрачається і пластичність у пристосуванні. *Хотіла б уточнити, чи вважає здобувач клональність перевагою у випадку зелених жаб?*

Другий розділ описує матеріал та методи його дослідження. Здобувач детально описує обсяг та походження матеріалу а також методи, які було використано під час дослідження. Частина розділу, де представлено методи є насиченою ілюстраціями результатів під час роботи із різними методами, що показує рівень володіння описаними методиками. В роботі було використано 8 різних методів, які є складними та трудомісткими за своїм алгоритмом виконання.

На жаль, мені не зрозуміло, чому використано саме таку кількість тварин при кожній із описаних методик (ст. 3 рукопису - “52 дорослих самців *P. esculentus* (30 гібридних самців з Нижнього Добрицького ставу, 7 самців з Корякова ставу, 8 самців з річки Мож, 7 самців з Іськова ставу)”, або ж ст. 101 рукопису - “Для більш детального вивчення гаметогенезу і аналізу формування бівалентів у мейозі, для чотирьох особин ми виконали порівняльну геномну гібридизацію...”) *Чи не краще було б уніфікувати кількість самців, із кожної водойми, для кожного із використаних методів? Також, цікавить, чому не з усіх самців було відібрано уринальну сперму, для співставлення даних по кожній особині в межах одного локалітету і між самими локалітетами?*

Третій розділ це результати дослідження. Розділ складається із двох великих підрозділів. Перший підрозділ присвячено детальному аналізу результатів дослідження складу ГПС кожного локалітету. Друга частина розділу демонструє результати дослідження гаметогенезу гібридних самців.

Під час вивчення матеріалу виникло запитання щодо вибірки із Іськового ставу. На ст. 105 – Рис. 3.1А показує, що після 2021 року не відбирали земноводних із Іськового ставу. *Чому тварин перестали відловлювати?* Також, на ст. 107 - Таблиця 3.1 здобувач показує склад вибірок з Іськового ставу та її вклад в роботу, але не бачу 2016 року, проте на Рис. 3.1А, 2016 рік є. *Що відбулося із 2016 роком в таблиці?*

Припускаю, що на ст. 108 є механічна опечатка, *оскільки диплоїди мали б мати еритроцити таки менше 28 мкм.*: “Методом цитометрії еритроцитів 43 гібриди були визначені, як диплоїдні, тобто мали еритроцити більше 28 мкм.”.

На ст. 110, ймовірно, автоматична помилка. Якщо було виявлено 41 гібрид, то не може в дужках подаватися 11 а потім ще 50, *ймовірно, мало бути 30?* “Вибірка 2020 року складалася з 46 особин, серед яких була одна диплоїдна ювенільна особина, чотири дорослі особини *P. ridibundus* (один самець, три самки) та 41 дорослої особини *P. esculentus* (11 триплоїдів (три самці, вісім самок) та 50 диплоїдів (26 самців, чотири самки)).”.

На ст. 131 здобувач пише: “В іншого самця (№867) ми не знайшли сперматид на предметних скельцях із суспензією клітин сім'яників, що свідчить про те, що цей самець був

стерильним.” Питання в наступному, які припущення щодо стерильності цього самця? Бачу, що біваленти метафази I є, чи було щось цікаве в пластинках чи ядрах цього самця і чи не намагалися взяти в нього уринарну сперму?

На ст. 134 здобувач демонструє Рис. 3.9 а в підписі пише, що, цитата: “Метафази в мейозі II (В, Г) з 13 унівалентами *P. ridibundus* (В); 13 унівалентів *P. lessonae* (Г).”, проте на фотографіях не очевидно є різниця між бі- та унівалентами. Як саме відбувалося встановлення фази поділу та яка різниця між пластинками рис. 3.9А та 3.9В?

На ст. 140 здобувач пише: “Це свідчить про відсутність інтрогресії між геномами *P. ridibundus* та *P. lessonae*.” і, очевидно, мова іде про ядерну ДНК, проте, цікаво чи перевіряли ймовірність інтрогресії мтДНК? Це може бути однією зі причин стерильності самців.

На ст. 143 здобувач демонструє унікальну знахідку ймовірності присутності в геномі спадкової інформації третього виду, цитую (далі йдеться про Рис. 3.12Л-О): “...3) сині – ті, які зафарбовувалися лише у DAPI-барвник і в яких не детектувався ані геном *P. ridibundus*, ані геном *P. lessonae*, ...” з чим, окрім, ймовірної інтрогресії третього геному, це може бути пов’язано і які припущення щодо цього третього виду?

Здобувач на 144 ст. пише про аномальну кон’югацію хромосом *P. ridibundus* і *P. lessonae*. Що, на думку здобувача, може бути результатом та причиною такої аномальної кон’югації? Чи можемо ми тоді говорити, що сперматозоїди таких особин несуть геном виключно одного з батьківських видів?

Розділ 4. Обговорення результатів дослідження

Сторінка 147 - “Проте, нещодавні дослідження показали, що ця система складається із як мінімум дев’яти клональних ліній *P. lessonae*,” Скільки є клональних ліній озерної жаби на думку здобувача в ГПС Іськова та Н. Добрицького ставів? Чи плануєте ви перевірити на унікальність клональні лінії жаби озерної для кожної із водойм? І чи виключає здобувач ймовірність періодичної міграції на розмноження до цих водойм жаби ставкової?

Сторінка 168 - ”Беручи до уваги, що гібридні самці в основному продукують суміш геномів R і L (Рис. 4.2), тоді як самки та триплоїдні гібриди з генотипом LRR продукують гамети R і RL, (тобто гібриди, отримують лессонівський геном від батька-гібрида), очікувалося б, що частка

гібридів мала б знижуватись, а частка особин *P. ridibundus* мала б збільшуватись.”. Цікаво було б оцінити коєволюцію клональних ліній із мітохондріальною ДНК, в якій також можливі інтрогресії, і незначні неспівпадіння в спільній роботі мтДНК та ядерної ДНК можуть вплинути на метаболізм/виживання і т.д. Це може стосуватися як батьківської форми, так і гібридних особин. Тим паче, якщо є підозра на інтрогресію третього виду в ядерній ДНК. Чи планує здобувач продовжувати дослідження в цьому напрямку?

Висновки

Сформувані із 5 пунктів, які є логічними та обґрунтованими і впливають із самого змісту роботи Елеонори Сергіївни.

Слід враховувати, що спірні та недостатньо прояснені питання, пов’язані зі сприйняттям дисертаційного дослідження, не нівелюють його цінності. В цілому, робота справляє дуже добре враження. Знайомство з цією роботою було дуже цікавим для опонента та викликало кілька ідей, які треба буде врахувати у подальшій роботі.

Висновок опонента.

На підставі проведеного аналізу можна зробити висновок, що за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, теоретичною і практичною цінністю, науковою новизною, достовірністю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків, оформленням роботи,

дисертаційна робота Пустовалової Елеонори Сергіївни “Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex)” є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам «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 12.01.2022 р. № 44) та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій». Вважаю, що Пустовалова Елеонора Сергіївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент,
завідувач еколого-гідробіологічної лабораторії
Шацького біолого-географічного стаціонару
Львівського національного університету ім. І. Франка,
кандидат біологічних наук за спеціальністю 03.00.08 – зоологія

Струс В.О.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 16:01:51 26.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук_Струс_на_Пустовалову_Е.С..pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 144.5 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Відгук_Струс_на_Пустовалову_Е.С..pdf
Розмір файлу без підпису: 143.2 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Струс Васирина Орестівна

П.І.Б.: Струс Васирина Орестівна

Країна: Україна

РНОКПП: 3288208388

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 16:01:48
26.01.2024

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF9704000000E50C1400EBF9E701

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2023.12.21 13:00

Голові разової спеціалізованої ради
Харківського національного університету
імені В.Н. Каразіна
доктору біологічних наук, професору
Володимиру СТРАШНЮКУ
Майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022

Відгук

офіційного опонента, старшого наукового співробітника НДЛ гідробіології, іхтіології та радіобіології НДІ біології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, кандидата біологічних наук Сергія Вадимовича ЄРМОЛЕНКА на дисертаційну роботу Елеонори Сергіївни ПУСТОВАЛОВОЇ «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб *Pelophylax esculentus complex*», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність роботи. Збереження генетичного різноманіття є актуальним завданням, оскільки це може впливати на стійкість та якість екосистем. Зелені жаби є одним з найбільш поширених комплексів амфібій на території України. Одним з феноменів зелених жаб є гібридогенний *Pelophylax esculentus complex*, який складається з двох батьківських видів: ставкової жаби, *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), озерної жаби, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1775) та міжвидових гібридів різної плідності. Особливістю *P. esculentus* є здатність одночасно продукувати гамети з клональним геномом від батька (гаплоїдний геном *lessonae*) і клональним геномом від матері (гаплоїдний геном *ridibundus*). Однак механізми, які забезпечують такий характер гаметогенезу ще не відомі та потребують подальших досліджень.

Мета дисертаційної роботи. встановити особливості гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus* complex з характерних геміклональних популяційних систем Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Наукова новизна отриманих результатів. 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. Також науково-практичне значення роботи підтверджується можливим використанням її даних в освітньому процесі.

Апробація результатів дисертації. За результатами досліджень опубліковано: 1 стаття у наукових журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus (Q1), 2 – що входять до переліку «Б» фахових, 9 – матеріали та тези наукових конференцій. Також опубліковано 4 наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації.

Особиста участь автора в отриманні конкретних наукових результатів, викладених у дисертації. Здобувачем проаналізовано значний обсяг вітчизняних і закордонних наукових джерел, проведено польові та лабораторні дослідження, відбірано та опрацьовано біологічний матеріал. Здобувачкою сформульовано основні положення дисертаційної роботи, надано практичні рекомендації та висновки, опубліковані наукові праці.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 253 сторінках. Основна частина дисертаційної роботи складається з наступних

розділів: вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати, обговорення, висновки, та викладена на 126 сторінках (без врахування 9 сторінок, на яких розміщені 9 ілюстрацій, які займають площу всієї сторінки). Текст дисертації містить 22 ілюстрації та 4 таблиці. Також робота включає список використаних джерел (309 посилань) і 3 додатки.

Оцінка мови, стилю: Оформлення, стиль мови та об'єм роботи відповідають вимогам МОН України щодо оформлення дисертаційних робіт на здобуття звання доктора філософії.

Ступінь обґрунтованості та достовірність наукових положень і рекомендацій. Достовірність результатів дисертаційної роботи забезпечується значним обсягом отриманого біологічного матеріалу, достатньо тривалим періодом досліджень та використанням валідних методів наукових досліджень.

Відповідність змісту дисертації спеціальності, за якою вона подається до захисту.

Зміст дисертації «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб *Pelophylax esculentus complex*» Пустовалової Елеонори Сергіївни повністю відповідає спеціальності 091 – біологія.

У розділі 1 «ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ» присвячений аналізу сучасної наукової літератури за темою дисертації. Надається детальний огляд особливостей репродуктивних стратегій у живих організмів, аналізуються різноманіття типів відтворення, особливості розмноження та цитологічні механізми відтворення гібридів. Також проведений огляд попередніх досліджень комплексів зелених жаб на території Харківської області, заплави р. Сіверський Донець.

У розділі 2 «ОБСЯГ ТА ПОХОДЖЕННЯ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ» надається опис районів досліджень та об'єму біологічного матеріалу, який був відібраний та проаналізований в ході виконання дисертаційної роботи. Детально розглядається методи визначення плоїдності за

допомогою циперметрії еритроцитів, визначення геному в клітинах сім'яників, отримання препаратів та обробки фотографій. Обґрунтовується вибір статистичних методів, що забезпечують достовірність отриманих результатів. Всі використанні методи відповідають світовим стандартам проведення наукових досліджень.

У розділі 3 «РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ» розглянуто склад ГПС у різних локалітетах. Досліджено особливості гаметогенезу гібридних самців *Pelophylax esculentus*. Визначено особливості каріотипів та видовий склад геномів в мітотичних та мейотичних клітинах сім'яників дорослих диплоїдних самців *P. esculentus* із визначених модельних ГПС.

У розділі 4 «ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ» висвітлюється важливість гібридних самців у підтримці та відтворення гібридів *P. esculentus* у кожній із досліджених локацій, розглядаються особливості гібридогенезу у гібридних самців із R-E-ГПС та роль амфіспермічних самців та різноманіття продукованих гамет у забезпеченні відтворення гібридів у різних популяційних системах Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб.

Загальні висновки дисертаційної роботи витікають з її результатів, вони логічні, обґрунтовані, базуються на статистичному аналізі і є завершенням поставлених завдань.

Питання та зауваження до дисертаційної роботи:

1. На сторінці 73 про надається інформація про те, що сусідні з Сіверським Донцем Харківської області регіони мають значно нижчий рівень різноманітності зелених жаб. При цьому в тексті не наводиться, яке саме “різноманіття” розглядає автор. Скоріш за все здобувачка розглядала генетичне різноманіття, що варто було зазначити в тексті.

2. На сторінці 85 здобувачка надає інформацію щодо районів досліджень, де відломлювались особини з популяцій зелених жаб. При цьому надаються координати у десятинному форматі з шістьма знаками в дробовій

частині. Скоріш за все матеріал був зібраний не в окремій точці, а на певній ділянці. Тому більш доцільно було округли значення до третього або четвертого знаку.

3. На сторінці 88 вказується, що відбір біологічного матеріалу для каріологічного аналізу відбувався шляхом умертвіння та анатомічного розтину жаб. Було б бажано додати інформацію щодо подальших заходів з утилізації біологічного матеріалу.

4. На рисунку 3.1 представлено графіки коливання чисельності дорослих особин *P. esculentus complex* із чотирьох досліджених локалітетів. По осі ординат представлені відсоткові значення та не надається підпис, тому не зрозуміло, про яку саме чисельність йде мова. Також у тексті авторка не наводить інформацію про що свідчать показники динаміки чисельності у відповідному графічному матеріалі.

5. На сторінках 107, 109, 111 у таблицях надається інформація про загальну кількість проаналізованих особин зелених жаб (дорослі та ювенільні особини). Оскільки це первина інформація, можливо було доцільно зробити ці таблиці у вигляді додатків.

Представлені зауваження та рекомендації не впливають на якість і наукову цінність дисертаційної роботи.

Висновок щодо дисертаційної роботи. На підставі проведеного аналізу можна зробити висновок, що кваліфікаційна наукова робота Пустовалової Елеонори Сергіївни на тему «Цитогенетичні механізми відтворення диплоїдних гібридних самців зелених жаб *Pelophylax esculentus complex*» відвідає вимогам пп. 14, 15, 16 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого постановою Кабінетну Міністрів України № 44 від 12.01.2022, а її автор Пустовалова

Елеонора Сергіївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 Біологія.

Офіційний опонент:

Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
НДЛ гідробіології, іхтіології та
радіобіології НДІ біології
Дніпровського національного
університету імені Олеся Гончара

Сергій ЄРМОЛЕНКО

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:56:20 26.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук_ЄРМОЛЕНКО_СВ.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 410.1 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Відгук_ЄРМОЛЕНКО_СВ.pdf
Розмір файлу без підпису: 422.7 КБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: ЄРМОЛЕНКО СЕРГІЙ ВАДИМОВИЧ
П.І.Б.: ЄРМОЛЕНКО СЕРГІЙ ВАДИМОВИЧ

Країна: Україна

РНОКПП: 3333112031

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 11:56:16
26.01.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F0400000099904401A2F3C504

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Серійний номер носія особистого ключа: 014

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: 3 повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2023.12.21 13:00