

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

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, професора закладу вищої освіти кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника Володимира Юрійовича СТРАШНЮКА на дисертаційну роботу Анни Олегівни ФЕДОРОВОЇ «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex», поданої на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

1. Обґрунтування вибору теми дослідження. Актуальність теми дисертаційної роботи обумовлена необхідністю проведення всебічного дослідження геміклональних популяційних систем. Такі популяційні системи існують на основі гібридогенезу, тобто способу існування особин, при якому постійно зберігається їх гібридний генотип. Класичним прикладом є *Pelophylax esculentus* complex. Зелена жаба *P. esculenta* є геміклональним гібридом жаб *P. ridibunda* і *P. lessonae*, що постійно відтворюється. Найчастіше нове гібридне покоління виникає в результаті схрещування гібридів, які передають клональні геноми, і одного з батьківських видів, який передає статеві геноми. Системи, в яких клональний і статевий геноми циркулюють одночасно, називаються геміклональними популяційними системами (ГПС).

Різні ГПС можуть відрізнятися за своїм складом, наявністю та відсутністю тих чи інших генотипів. Вивчення складних механізмів відтворення та підтримання складу різноманітних типів ГПС вимагає наявності різнобічних методологічних підходів – від класичних морфологічних досліджень до більш специфічних цитогенетичних, молекулярних, етологічних. З часом ці методи вдосконалюються та зазнають модифікацій, розробляються нові методи дослідження. Адекватність, ефективність і зручність у застосуванні цих методів на практиці потребує уваги і всебічного аналізу. То ж вибір теми дослідження є цілком обґрунтованим.

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

Дисертаційна робота викладена на 207 сторінках, складається з анотацій українською та англійською мовами, змісту, основної частини, списку використаних джерел (227 посилань) та 10 додатків. Основний текст складається з наступних частин: вступ, огляд літератури (розділ 1), матеріали і методи дослідження (розділ 2), результати та обговорення (розділи 3-5), висновки, та викладена на 118 сторінках. Текст дисертації містить 32 ілюстрації та 19 таблиць.

У вступі автором представлено обґрунтування вибору теми дослідження, мету та завдання дослідження, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, дані про публікації та апробації результатів дослідження за темою дисертаційної роботи.

У розділі 1 проаналізовано сучасний стан досліджуваних проблем за даними літератури. Зокрема, йдеться про гібридогенез та геміклональне спадкування у зелених жаб, методологічні підходи, які застосовуються при вивченні різноманіття зелених жаб. Наведені дані цілком підтверджують обґрунтованість і актуальність обраної теми дослідження.

У розділі 2 цілком повно наведені дані про матеріали і методи, які були використані у ході дослідження. Обсяг матеріалу цілком достатній для досягнення поставленої мети. Методи сучасні й адекватні завданням дослідження. Значущість отриманих результатів перевірена відповідними статистичними методами. Дослідження виконане без порушення біоетичних норм проведення експериментальних робіт з тваринами відповідно до висновку біоетичної комісії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 1/23 від 15.03.23).

У розділі 3 автор обговорює результати власних досліджень. Отримані результати добре проілюстровані у вигляді значної кількості рисунків, фотографій та представлені у таблицях. Опис та обговорення результатів у кожному підрозділі завершується висновками.

Висновки дисертації цілком відповідають отриманим результатам.

Анотація відповідає змісту і основним положенням дисертації.

На підставі вивчення тексту дисертації здобувача, наукових праць здобувача та Протоколу контролю оригінальності встановлено, що дисертаційна робота виконана самостійно, текст дисертації не містить плагіату, дисертація відповідає вимогам академічної доброчесності.

3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Частина дослідження пов'язана з мікросателітним та біоакустичним аналізом виконана за підтримки Slovak Academic International Agency (номер гранту 1/0286/19) та Researchers at Risk Fellowship від Чеської Академії Наук (номер гранту RRFU-22-20).

4. Обґрунтованість та достовірність наукових положень, результатів і висновків дисертації забезпечена використанням адекватних, сучасних методів дослідження, зокрема, для отримання матеріалів для дослідження збирання вибірок *Pelophylax esculentus* complex проводилося у природних місцеперебуваннях; таксономічну приналежність та стать визначали за морфологічними ознаками; застосовували цитометрію еритроцитів та сперматозоїдів; цитогенетичні методи (каріоаналіз метафазних хромосом, сріблення хромосомних препаратів, флуоресцентна гібридизація *in situ*); молекулярні методи (мікросателітний аналіз, аналіз SNP гену *uqcrfs1*); електрофорез білкових маркерів (алозими ЛДГ-1); гібридологічний метод (штучні схрещування в лабораторних умовах); біоакустичний аналіз криків вивільнення; аналіз зовнішніх морфологічних аномалій. У роботі застосовані адекватні статистичні методи аналізу, зокрема, дисперсійний аналіз, критерій Краскела-Воліса, кореляційний аналіз, дискримінантний аналіз, аналіз головних компонент тощо. Значущість і достовірність основних наукових положень і висновків дисертації базується на достатній кількості експериментального матеріалу. Зроблені висновки теоретично обґрунтовані та цілком відповідають отриманим результатам.

5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна. У роботі проведено комплексний аналіз та модифікацію деяких вже існуючих методів, а також розробку та апробацію нових методів дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*. Розроблено новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків, який дозволяє залишати тварин живими. Оцінено ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення, цитометрії еритроцитів та цитометрії сперматозоїдів для визначення таксономічної приналежності та/або плідності особин та їх гамет. Визначено неефективність використання криків вивільнення як видоспецифічного маркеру для представників роду *Pelophylax*. Комбінація морфологічних, цитометричних, молекулярних, цитогенетичних та гібридологічного методів була успішно використана для дослідження особливостей гаметогенезу, відтворення та смертності зелених жаб з декількох типів ГПС. Отримано нові дані, що стосуються особливостей підтримання складу декількох ГПС за рахунок вибіркової смертності частини потомства. Отримані результати показали ефективність використання комбінації різних методів для цілісної оцінки механізмів, завдяки яким різноманітні ГПС підтримують свою стабільність.

6. Апробація дисертації та публікації. Основні положення дисертації представлені на шести міжнародних та трьох вітчизняних наукових та науково-практичних конференціях та симпозіумах. Результати дослідження викладені у дев'яти наукових працях автора, серед яких чотири статті у періодичних

наукових виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science, три статті у наукових фахових виданнях України, а також в одинадцяти публікаціях апробаційного характеру. Результати дисертаційної роботи цілком повно відображено в публікаціях.

7. Практичне значення отриманих результатів. Проведений аналіз методів дослідження зелених жаб, що вже існують, розробка, модифікація та апробація нових методів дозволяють ефективніше підходити до дослідження різноманіття зелених жаб. Результати отримані в ході використання комплексу запропонованих методів представляють важливе значення для розуміння особливостей гібридогенезу та вибіркової смертності в геміклональних популяційних системах різного складу. Розроблений новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання при вивченні інших видів амфібій.

8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації.

Деякі положення дисертації викликають запитання. Зокрема, маю такі зауваження:

- Вочевидь, гібридогенез базується на статевому розмноженні. Чомусь автор вважає інакше (с. 24).
- У розділі 1.3.2. Цитометрія еритроцитів для визначення плоїдності (с. 37) сказано: «Поліплоїдність не є поширеною серед птахів та ссавців». Варто було б уточнити, що про яку саме форму поліплоїдії йдеться. Адже соматична поліплоїдія у ссавців цілком звичайне явище.
- Розділи 5.1.1. (с. 111 - 112) та 5.3.1. (с. 128–130) присвячені вивченню складу ГПС в Іськовому ставі та Нижнього Добрицькому ставі. Зокрема, йдеться про співвідношення статей. Щодо цього, є запитання: яким чином детермінується стать у зелених жаб – генетично (genetic sex determination) чи модифікаційно (environmental sex determination)? Вочевидь, це питання має стосунок до механізмів і чинників, що визначають склад ГПС.
- Робота присвячена аналізу і розробці методів встановлення складу природних ГПС *Pelophylax esculentus* complex. І автор чітко слідує поставленим завданням. Однак в роботі є результати, які потребують пояснень з точки зору біологічного значення досліджуваних закономірностей. Наприклад, які адаптивні переваги мають ті чи інші генотипи – гібридні, триплоїдні чи диплоїдні, з тією чи іншою комбінацією геномів? Що робить життєздатним і конкурентоспроможним існування такого складного комплексу?
- Деякі висновки дисертації дещо перевантажені. Наприклад, висновок 1 (с. 139) займає 16 строчок і містить три абзаци. Його варто було б

викласти у більш стислій формі без зайвих пояснень, які вже були зроблені в основному тексті.

- У формулюванні висновку 5 (с. 140) не зовсім зрозуміло про що йдеться: про розмір геному в сперматозоїдах зелених жаб, чи про їхню плоїдність. Адже це різні речі.
- Дисертаційна робота має виражене практичне спрямування. Певно, що на основі отриманих результатів і методичних розробок варто було б сформулювати практичні рекомендації. Однак в роботі вони відсутні.
- У тексті дисертації зустрічаються граматичні помилки і помилки форматування тексту.

Варто зазначити, що висловлені зауваження не змінюють загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи.

9. Загальні висновки. Дисертаційна робота А. О. Федорової на тему «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex» 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».

За рівнем теоретичної обґрунтованості, новизною та практичним значенням результатів дисертація є завершеною самостійно виконаною науковою працею, а її автор Анна Олегівна Федорова заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Рецензент

доктор біологічних. наук,
старший науковий співробітник,
професор закладу вищої освіти
кафедри генетики і цитології
Харківського національного університету
імені В. Н. Каразіна

Володимир СТРАШНЮК

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 14:43:33 18.01.2024

Назва файлу з підписом: Федорова А. О._Рецензія_Дис..docx.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 177.7 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Федорова А. О._Рецензія_Дис..docx.pdf
Розмір файлу без підпису: 181.6 КБ

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

Підписувач: СТРАШНЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

П.І.Б.: СТРАШНЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

Країна: Україна

РНОКПП: 2253400916

Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 14:43:31 18.01.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"

Серійний номер: 5E984D526F82F38F04000000444F320100209804

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 Анатолію БОЖКОВУ
майдан Свободи 4, м. Харків, 61022

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, доцента закладу вищої освіти кафедри зоології та екології тварин біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, кандидата біологічних наук, Тетяни Андріївни АТЕМАСОВОЇ на дисертаційну роботу Анни Олегівни ФЕДОРОВОЇ «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus complex*», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

1. Обґрунтування вибору теми дослідження

Дисертаційна робота присвячена дослідженню різноманіття методів та підходів до вивчення зелених жаб роду *Pelophylax*, та їх практичного застосування. Зокрема, частина роботи присвячена розробці нового протоколу отримання хромосомних препаратів, та перевірки ефективності існуючих методик та підходів до визначення плоідності і таксономічної приналежності зелених жаб. Також останній розділ роботи присвячений використанню комбінації запропонованих і проаналізованих методів для встановлення складу та характеру відтворення зелених жаб у конкретних типах геміклональних популяційних систем (ГПС).

Результати отримані в ході використання комплексу запропонованих методів представляють важливе значення для розуміння особливостей гібридогенезу та вибіркової смертності в геміклональних популяційних системах різного складу.

Однак, враховуючи низку вад у існуючих методів визначення таксономічної приналежності та статі, методологічна база досліджень потребує розширення та вдосконалення, зокрема розробки додаткових методів.

Враховуючи сказане, актуальність дисертаційної роботи Федорової Анни Олегівни не викликає сумніву.

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

Дисертаційна робота викладена на 203 сторінках, складається з анотації, змісту, основної частини, списку використаних джерел (227 посилань) та 9 додатків. Основна частина складається з наступних частин: вступ, огляд літератури (розділ 1), матеріали і методи дослідження (розділ 2), результати та обговорення (розділи 3-5), висновки, та викладена на 118 сторінках. Текст дисертації містить 32 ілюстрації та 19 таблиць.

Огляд літератури є змістовним і дає вичерпне уявлення про гібридогенез та геміклональне спадкування зелених жаб. Також детально описані всі наявні літературні відомості про особливості структури геміклональних популяційних систем зелених жаб та різноманіття типів ГПС, а також механізми підтримки їх стабільності. Ретельно проаналізовано всі існуючі методичні підходи до вивчення геміклональних популяційних систем зелених жаб з аналізом можливостей, що надає той чи інший метод та його недоліків. Розгорнуті дані добре окреслюють спектр питань, які потребують подальшого дослідження. Зокрема, це необхідність розширення методологічних підходів до вивчення різноманіття зелених жаб – для більш повного охоплення всіх вікових груп.

В розділі «Матеріали та методи дослідження» відмічені проаналізовані зразки від 1200 екземплярів зелених жаб на різних стадіях стиглості та вказані джерела надходження матеріалу. Важливо, що авторка використала як власні зібрані в польових умовах матеріали, так і колекції, люб'язно надані зарубіжними колегами. Це дало можливість залучити до порівняльного аналізу об'ємний матеріал. Дослідження проводились на матеріалі, який здебільшого складається із власних зборів, або зборів, що проводилися під час щорічних моніторингів декількох ГПС разом з колективом лабораторії популяційної екології амфібій, кафедри зоології та екології тварин, біологічного факультету, Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, в якій дисертантка проводила основну частину дисертаційного дослідження. Частина матеріалу, що використовувався для біоакустичного аналізу та аналізу геномів в ооцитах самиць зелених жаб, надані Лукасом Холевою, Марією Долежалковою-Каштанковою та Веронікою Лабаєвою (Інститут фізіології та генетики тварин, Чеська республіка) та Василю Струс (Львівський національний університет імені Франка, Україна).

Розділ також містить інформацію щодо розташування 9 локацій збору матеріалу. Особливо хочеться відмітити надзвичайно широкий спектр застосованих автором методів аналізу даних, які логічно доповнюють один одного і створюють комплексне уявлення щодо структури ГПС різних локацій півночі та північного сходу України.

Методи дослідження включають морфометричний та акустичний аналіз; застосовано молекулярні методи (рестрикційний аналіз, метод проточної ДНК-цитометрії, мікросателітний аналіз тощо), секвенування; дослідження гаметогенезу.

Розділи 3-5 містять результати власних досліджень та їх обговорення. Матеріали викладені послідовно, опис результатів дослідження зроблено ретельно. Розділ 3 містить оцінку методів ідентифікації таксономічної приналежності, плоідності та геномної композиції зелених жаб. Дисертанткою проведено аналіз польових матеріалів (вибірка з Чорнобильського радіаційно-екологічного заповідника) – пуголовки, ювенільні та дорослі особини. Було застосовано різні методи – акустичні, морфологічні, вимірювання еритроцитів, тощо. Знайдено триплоідні гібриди, що свідчить про наявність у Чорнобильській зоні відчуження складніших геміклональних популяційних систем, ніж вважалося до цього, - місцями навіть більш складною, ніж більшість складних ГПС, що вивчалися на території України.

В розділі 4 проаналізовано особливості гаметогенезу різних форм зелених жаб та різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС. Авторкою проведено аналіз розмірного розподілу сперматозоїдів та визначення плоідності сперми за розміром сперматозоїдів. Встановлено, що вимірювання розмірів сперматозоїдів не може бути надійним методом для ідентифікації самців, що потенційно продукують диплоідні гамети.

В розділі 5 описано використання запропонованих методів для встановлення особливостей відтворення гібридів в природних ГПС. Під час дослідження відтворення в R-Erf-ГПС показало, що триплоїдні гібридні самиці з генотипом LLR передають в своїх гаметах геном L і при схрещуванні з самцями *P. ridibundus* в їх потомстві утворюються диплоїдні та триплоїдні самці і самиці з генотипами LR та LLR. Три з чотирьох форм авторка не спостерігала серед вибірок дорослих особин, що на думку дисертанта, пов'язано із їх загибеллю до набуття статевої зрілості.

Висновки в цілому відповідають меті та завданням дисертаційного дослідження і є вичерпними.

Дисертація написана українською літературною мовою, майже відсутні граматичні та стилістичні помилки.

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

Основна частина дисертаційної роботи виконана у лабораторії популяційної екології амфібій, кафедри зоології та екології тварин, біологічного факультету, Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Частина матеріалу, що використовувався для біоакустичного аналізу та аналізу геномів в ооцитах самиць зелених жаб, надані Лукасом Холевою, Марією Долежалковою-Каштанковою та Веронікою Лабаєвою з Інституту фізіології та генетики тварин, Чеська республіка, де дисертація була завершена. Частина роботи пов'язана з мікросателітним та біоакустичним аналізом виконана за підтримки Slovak Academic International Agency (номер гранту 1/0286/19) та Researchers at Risk Fellowship від Чеської Академії Наук (номер гранту RRFU-22-20).

4. Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Значний об'єм досліджуваного матеріалу, методи його дослідження, отримані результати та ілюстрації до них, володіння власними та літературними даними за темою роботи є вагомими і достатні, щоб вважати матеріали дисертаційної роботи достовірними, а висновки обґрунтованими.

5. Основні наукові результати, одержані автором, та їх новизна. Дисертантка отримала наступні основні наукові результати

Результати дисертаційної роботи розширили уявлення щодо різноманіття структури геміклональних популяційних систем зелених жаб Півночі та Північного Сходу України. Авторкою запропоновано нову методику прижиттєвого визначення плоідності пуголовків, який дозволяє залишати тварин живими та неушкодженими. Метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання у інших видів амфібій.

Авторкою було оцінено ефективність використання біоакустичного критерію, цитометрії еритроцитів та цитометрії сперматозоїдів для визначення таксономічної приналежності та/або плоідності особин та їх гамет. Згадані вище методи в комбінації з класичними молекулярними та цитогенетичними методами були успішно використані для дослідження особливостей гаметогенезу, відтворення та смертності зелених жаб з декількох типів ГПС. Отримані результати показали ефективність використання

комбінації різних методів для цілісної оцінки механізмів, завдяки яким різноманітні ГПС підтримують свою стабільність. Результати дисертаційного дослідження досить повно викладені в наукових публікаціях, з яких 6 статей у зарубіжних наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних (Web of Science, Scopus) Q2 і три журнали в Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 3 - у виданнях з переліку МОН України, 14 тез конференцій (з них 1 є зарубіжною).

6. Апробація дисертації та публікації.

Результати роботи були представлені на 9 наукових конференціях (опубліковано 12 тез) як в Україні, так і за кордоном (Шотландія, Литва). Результати роботи опубліковано у рецензованих періодичних виданнях України (3 статті) та 6 статтях у міжнародних наукових періодичних виданнях, що включені до БД Scopus та WoS.

7. Практичне значення отриманих результатів

Результати дисертаційної роботи можуть використовуватися для вдосконалення досліджень геміклональних популяційних систем, зокрема – на підставі отриманих даних можливо створення моделей. Дисертантка під час роботи брала участь у навчальному процесі, допомагаючи студентам опановувати складні методики, будувати дослідження, збирати польовий матеріал. Матеріали роботи можуть використовуватися під час викладання навчальних курсів «Зоологія хребетних», «Іхтіологія та герпетологія», «Моделювання складних систем у біології».

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

8. Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації

У переліку методів хотілось би бачити більш академічні назви методів, що застосовувались для аналізу матеріалу. «Збирання вибірок *Pelophylax esculentus complex* з природних місцеперебувань» не є методом, це один з обов'язкових етапів досліджень.

Морфометричні дослідження, з-поміж іншого, містять інформацію про велику кількість молодих тварин з аномаліями (нестача кінцівок, додаткові утворення, тощо). Робиться висновок про достовірну різницю молодих з порушеннями розвитку та дорослих форм без аномалій. Але це, мабуть, є очевидним, бо до дорослого віку особини з аномаліями просто не доживають. Становить певний інтерес причини розвитку таких аномалій, бо у роботі С.Катрушенко, на яку посилається авторка, не знайдено значущої залежності кількості аномалій розвитку з рівнем антропогенного впливу.

З приводу акустичного аналізу: для визначення систематичного приналежності використано «крик вивільнення». Загалом це має свої підстави – зарубіжними дослідниками визнано, що можна з великою часткою вірогідності застосовували такий сигнал для визначення систематичної приналежності у зелених жаб. До того ж, його простіше отримати. Але, навіть з суто біологічних міркувань – шлюбний сигнал є більш показовим для систематики (будь-якого організму, не тільки жаб), бо саме він є складовою комплексу, що сприяє репродуктивній ізоляції. Висновку, що «сигнал вивільнення» непридатний для вирішення систематичних питань дійшла, нарешті, і власне, авторка пропонованої дисертації.

Дисертаційна робота Федорової Анни Олегівни «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus complex*» є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» (з наступними змінами) та «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 12.01.2022 р., а її автор Федорова Анна Олегівна заслуговує присудження їй ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний рецензент,
кандидат біологічних наук,
доцент кафедри зоології та екології тварин
біологічного факультету
Харківського національного університету
імені В. Н. Каразіна

Тетяна АТЕМАСОВА

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 15:15:59 25.01.2024

Назва файлу з підписом: Рецензія Федорова1.pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 610.1 КБ

Назва файлу без підпису: Рецензія Федорова1.pdf

Розмір файлу без підпису: 601.3 КБ

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

Підписувач: Атемасова Тетяна Андріївна

П.І.Б.: Атемасова Тетяна Андріївна

Країна: Україна

РНОКПП: 2331101002

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 15:15:12 25.01.2024

Сертифікат виданий: КНЕДП АТ "УКРСИББАНК"

Серійний номер: 4723196C41B46DB6040000007E630300190F0E00

Тип носія особистого ключа: Незахищений

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Удосконалений

Тип контейнера: Підпис та дані в одному файлі (CAAdES enveloped)

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

Сертифікат: Кваліфікований

Голові разової спеціалізованої
вченої ради Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна
професору Анатолію БОЖКОВУ
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 Федорової Анни Олегівни

“Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus complex*”,
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія
з галузі знань 09 – Біологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Робота Федорової Анни Олегівни присвячена розробці нових та аналізу ефективності вже існуючих методів вивчення зелених жаб роду *Pelophylax*, та їх застосування для визначення складу та механізмів відтворення зелених жаб у геміклональних популяційних системах. 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. Різноманітні комбінації видів та типів гібридів формують геміклональні популяційні системи – ГПС. Це новий рівень співіснування створює чимало викликів для науковців. Розуміння зв’язків між усіма елементами таких систем вимагає комплексного підходу до вивчення зелених жаб а подекуди і розробки нових методів. Ми достеменно досі не розуміємо як особини в межах ГПС обмінюються генетичною інформацією, яким чином забезпечується стабільність системи і що викликає її занепад. З новими дослідженнями з’являються нові запитання, які необхідно вирішувати і, часом, змінювати свої попередні уявлення про процеси, які формують ГПС. Два батьківські види, гібридна форма, яка може бути поліплоїдною, існування ГПС із виключно гібридами однієї статі, існування ГПС із виключно гібридами різної плоїдності без присутності батьківських видів, участь батьківських видів в інших типах міжвидової гібридизації на заході Європи, суимагає комплексного, ймовірно, навіть глобального розуміння групи та врахуванні різноманітних методів для її дослідження. Ми не можемо досліджувати зелених жаб виключно класичними морфологічними методами, робота Анни Олегівни ще раз наголошує на тому, що навіть такі методи, які вимірювання розміру еритроцита не є достовірними на різних етапах оцінки плоїдності особини.

Основна увага дослідження приділяється аналізу великої кількості сучасних молекулярних методів дослідження складу ГПС та плоїдності соматичних та статевих клітин а також порівняння їх із класичними методами. Варто наголосити, що більшість недорогих і простих у виконання методів точного визначення проїдності особин вимагають аналізу клітин тканин здебільшого внутрішніх органів, і, очевидно, для цього необхідно аби тварина вже була мертвою. Це завжди викликає певні суперечливі відчуття, оскільки є розумінням для чого це

необхідно зробити, як і усвідомлення вбивства тварини. Тому, прижиттєвий протокол визначення плоїдності у пуголовків, які в подальшому можна доростити до метаморфозу і, в перспективі, використати неодноразово для різноманітних варіантів схрещування, є надзвичайно позитивним результатом цієї роботи, і не можливо переоцінити актуальність такого методу. Також, комплексна оцінка методів і порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС, який сформовано в результаті цієї роботи дозволить уніфікувати алгоритм роботи на інших територіях. Таке узгодження дизайнів експериментів надасть, в перспективі, можливість мати базу порівнюваних даних, які можна буде між собою співставити та використовувати для оцінок процесів, які забезпечують стійкість ГПС на різних територіях.

Анна Олегівна працює у регіоні, де зелені жаби мають тривалу історію досліджень, проте, її дослідження є першим аналізом складу ГПС *Pelophylax esculentus* complex Сіверсько-Донецького центру різноманіття із такою кількістю різноманітних методик. Здобувачем було обрано репрезентативні модельні геміклональні популяційні системи (ГПС) *Pelophylax esculentus* complex досліджуваного центру різноманіття зелених жаб, до складу яких входять різноманітні форми гібридних особин. Здобувачка провела детальний аналіз ефективності вже існуючих методів вивчення зелених жаб роду *Pelophylax*, та їх застосування для визначення складу та механізмів відтворення зелених жаб у геміклональних популяційних системах. Результатом роботи є прижиттєвий протокол встановлення плоїдності пуголовків зелених жаб на регенеруючій тканині хвостового плавника а також розробка комплексу методів та порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС. Деякі з аналізованих методів визнані здобувачкою як такі, які не забезпечують викорого рівня достовірності при їх використанні і можуть бути корисними тільки у комплексі із молекулярними методами. 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”, моделювання розвитку ГПС а також правильного уніфікованого дизайну майбутніх досліджень групи зелених жаб як в Україні, так і за її межами.

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 складу ГПС та типів геномів, які передаються. Розробка прижиттєвого методу аналізу плоїдності пуголовків є надзвичайно важливим для вдосконалення експериментальних дизайнів наступних досліджень як в Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття зелених жаб, так і в інших локалітетах, оскільки протокол є універсальним для зелених жаб. Отримані дані є практичними і представляють важливе значення для розуміння особливостей гібридогенезу та вибіркової смертності в геміклональних популяційних системах різного складу. Розроблений новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання у інших видів амфібій.

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.

У роботі проведено комплексний аналіз та модифікацію деяких вже існуючих методів, а також розробку та апробацію нових методів дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*. Робота цінна тим, що дає нові підстави для вибору комплексу методів для вивчення групи зелених жаб.

Обґрунтованість і достовірність наукових висновків. Метою роботи є розширення комплексу методів встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex. Для дослідження складних механізмів відтворення та підтримання складу різноманітних типів ГПС необхідно визначати генотипи особин, які входять до складу ГПС, типи гамет які вони передають, тощо. Це вимагає наявності великої кількості методів (від класичних морфологічних досліджень до більш специфічних цитогенетичних, молекулярних та етологічних) та постійної модифікації і розробки нових. Під час роботи Анна Олегівна перевіряла ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення в якості видоспецифічного маркера для жаб роду *Pelophylax*; розробляла метод прижиттєвого визначення плоідності пуголовків; порівнювала стійкість розвитку (аномалії розвитку) у різних форм зелених жаб; перевіряла ефективність використання цитометрії еритроцитів для детекції триплоїдних гібридів в ГПС та ефективність вимірювання розмірів сперматозоїдів для визначення їх плоідності; використовувала комплекс методів для дослідження складу, вибіркової смертності, характеру відтворення та різноманіття геномів, що передаються в досліджуваних ГПС; порівнювала ефективність використаних методів на кожному етапі роботи. Результатом використання вище описаних методик є розроблений комплекс методів і порядок їх використання для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС. Кожен етап роботи здобувачка супроводжує використанням коректних статистичних методів аналізу отриманих результатів. У роботі було використано та проаналізовано більше 15 різних методів на загальній вибірці у більше ніж 1200 представників роду *Pelophylax*.

В цілому, завдання формують логічний і послідовний комплекс. У роботі використано широкий спектр методів, які дозволяють отримати достовірні дані та значущі результати їх порівняння та вдосконалення. 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 Анни Олегівни відповідає сучасним вимогам. Робота на тему «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex» представлена чотирма публікаціями у 2022-2023 роках у чотирьох виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science. Також є три публікації у двох наукових виданнях, які включені до переліку наукових фахових видань України у 2021-2022 роках. З 2018 року результати роботи було представлено на 11 конференціях. Також є 2 додаткові публікації (2022 р.) у профільному журналі - "Reptiles & Amphibians", які додатково представляють результати роботи здобувачки.

Оцінка мови, стилю та оформлення дисертації. Дисертаційна робота викладена на 207 сторінках з яких 118 сторінок тексту самої дисертації. Робота складається з анотації (українською та англійською мовами), змісту, 5 розділів, висновків, списку літератури та додатків. Кожен розділ представлений графічним матеріалом (Розділ 1 – 1 рисунок, розділ 2 – 5 рисунків та 1 таблицю, розділ 3 – 16 рисунків та 9 таблиць, розділ 4 – 5 рисунків та 2 таблиці, розділ 5 – 5 рисунків та 7 таблиць). Висновки складаються з 7 пунктів. Список використаних джерел демонструє коректну роботу з великим обсягом літератури (227 посилань з них 215 - латиницею). Робота містить 10 додатків, які доповнюють інформацію із основної частини роботи здебільшого таблицями (додатки 2-10) та списком публікацій здобувачки, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації (додаток 1).

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 та інше. Детальніше щодо кожного побажання інформація нижче:

- Сторінка 4 "... Львівський національний університет імені Франка, Україна.", краще було б дати повну назву установи, пропущено ім'я Франка і мало б бути Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна.
- Сторінка 6 "... і в подальшому приймають участь розмноженні..." мало б бути "участь в розмноженні".
- Сторінка 17 "Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації" не уніфіковано виділення жирним прізвища здобувачки. Аналогічне не сторінці 173.
- Сторінка 23 "... вибіркова смертність одних форм в потомстві та виживання інших, тощо. Для" після цього закінчується абзац, ймовірно, слово "для" є зайвим.
- Сторінка 26 "Використати комплекс морфологічних, гібридологічного, молекулярних та цитогенетичних методів для дослідження складу...", ймовірно, таки маєтсья на увазі використання "гібридологічних" методів, закінчення слова добре було б змінити. Таке ж зауваження на ст. 140.
- Сторінка 27 "Збір та аналіз біоакустичних даних проведені здобувачкою", напевно, мало бути "проведені".
- Сторінка 32 "... відповідно батьківськи види...", ймовірно, мало б бути "батьківські".
- Сторінка 35 "... через накопичення мутацій в клонально передаваних геномах,...", ймовірно, краще було б перефразувати на "через накопичення мутацій в геномах, які передаються клонально".
- Сторінка 36 "... та шлюбних мозолей на передніх лапах у самців.", слово "мозоль" в множині родового відмінку мав би бути "мозолів".
- Сторінка 38 "Більш того, розмір еритроцитів також пов'язаний з рядом інших факторів факторів,..." продубльовано слово "факторів".
- Сторінка 50 "... експериментальних робіт з тваринами відповідно...", є помилка в слові "робіт".
- Сторінка 57 "Для проведення білкового електрофорезу в ПААГ..." при першому згадуванні аббревіатури поліакриламідного гелю, було б добре дати його повну назву.
- Сторінка 70 "... приблизно однаковим періодом тиші між ними (Рис. 3.1.2.1 А, Б)." посилання на рисунок невідповідне, оскільки такий рисунок в рукописі відсутній, очевидно, мова іде про Рис 3.3.
- Сторінка 77 "Більш того. Для *Pelophylax esculentus* complex..." замість коми стоїть крапка, через що слово "для" автоматично написано з великої букви. На цій же сторінці "... в даний аналіз другий батьківський від *P. lessonae*...", очевидно, мова іде про "вид", ймовірно помилка у слові "від".
- Сторінка 96 "... томи довгий час вважалося, що там існують тільки диплоїдні ГПС..." тут помилка у слові "тому".
- Сторінка 96 "Територія досліджень включала: ріку Прип'ять (в м. Чорнобиль; 51.2724, 30.2448) та її пойму (51.3414, 30.199), ріку Уж (51.2738, 29.7418) та її пойму (51.2567, 30.222),..." правильніше було б використати слово "заплава", оскільки "пойма" це не український термін. Аналогічна рекомендація на ст. 97.
- Сторінка 114 "... 6 триплоїдних гібридів мали генотип LRR, і тільки одна особина виявилась батьківським видом *P. ridibundus*." в таблиці 5.1, на яку іде посилання та цитований текст вище, дещо інші цифри, хотілося б уточнити де коректні цифри?
- Сторінка 116 "... у випадку наявності трьох гетерозиготних локуси..." в слові "локусів" пропущені букви.
- Сторінка 117 "... (одного дорослого і один пуголовка), всі інші були унікальними." некоректне відмінювання слова "один", мало б бути "одного пуголовка". Також, "... в басейні

Сіверського (Biriuk et al., 2016;...)” пропущено другу частину назви річки, мало б бути “Сіверського Дінця”. Наступне “Даний феномен також спостерігається зелених жаб з інших частин Європи...” пропущено зв’язку між “спостерігається” та “зелених жаб”, очевидно мало б бути “... спостерігається у зелених жаб...”.

- Сторінка 122 “... подвоєння L-геному в усіх яйцеклітинах (самиці LLR в R-Erf-HPS продукують виключно або частково гаплоїдні L гамети, геном яких подвоюється після запліднення, що призводить до формування триплоїдних зигот.” бракує дужки, яка б закривала текст в кінці сформованої думки.
- Сторінка 123 ”Гіпотетичне припущення про продукування диплоїдних гамет самцями *P. ridibundus* могло би пояснити утворення LRR гібридів (дані форми відсутні у досліджуваній ГПС), але не. Таким чином, даний парадокс може бути пояснений лише двома гіпотезами:...” не зрозуміле розставлення розділових знаків, речення закінчується чи це мала б бути кома?
- Сторінка 171, Додаток 1. Список публікацій здобувачки, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації, нумерація списку неузгоджена по різних пунктах, наприклад, є 4 публікації у виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз а наступна частина додатку з публікаціями, які є у виданнях, які включені до переліку наукових фахових видань України починаються із цієї ж цифри 4. Наступні списки починаються із цифри “3” та “12”.
- Сторінка 175, Додатки 2-10 було б добре підписати, оскільки не відразу очевидна різниця між таблицями, наприклад, Додатка 2 та додатка 3.

Аналіз змісту дисертації. Перший розділ це огляд літератури присвячений детальному аналізу доступної інформації. Анна Олегівна розповідає про гібридогенез та геміклональне спадкування зелених жаб та методологічні підходи до вивчення різноманіття зелених жаб. Здобувачка дискутує над перевагами та недоліками усіх використаних нею методів, Наприклад, визначення таксономічної приналежності та статі за морфологічними ознаками має очевидні недоліки, такі, як велика ймовірність помилкового визначення виду чи невідповідність методу для молодих особин про що згадує здобувачка. Детально обговорено надійність використання цитометрії еритроцитів для визначення плоїдності та акцентовано на надійності методу аналізу каріотипу при встановленні плоїдності особини. Варто наголосити, що Анна Олегівна критикує каріологічний аналіз, як такий, для проведення якого необхідно вбивати тварину, з чим, звичайно, не можна погодитися. Пошук прижиттєвих методів для такого аналізу є актуальним та необхідним. Далі дисертантка продовжує із методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). Серед молекулярних методів здобувачка зосереджує увагу на обговоренні рестрикційного аналізу, ПЛІР SAI-1 (Serum albumin intron-1, SAI-1), мікросателітного аналізу, проточної ДНК цитометрії та секвенуванні одонуклеотидних поліморфізмів (SNP, single nucleotide polymorphisms). При визначенні геномів в гаметах здобувачка акцентує увагу на аналізі хромосом типу лампових щіток з ядер ооцитів, аналізі білкових маркерів та ДНК цитометрії сперматозоїдів. Також, детально описує сучасні уявлення про використання біоакустичних методів, зокрема, криків вивільнення, в таксономії безхвостих амфібій. Розділ завершує інформація про аномалії розвитку зелених жаб та їхню потенційну діагностичність нестабільності середовища.

Розділ написано змістовно, проте хотіла б звернути увагу на сторінку 31, здобувачка пише: “Гібридизація (утворення потомства від схрещування особин різних видів) є доволі розповсюдженою в природі, і кількість нових таксонів гібридного походження постійно зростає завдяки покращенню молекулярних методів (Abbott et al., 2013; Barton, 2001; Chan et al., 2019; Payseur & Rieseberg, 2016).” *Як на мене, краще б було децю змінити акцент у реченні, оскільки, ми дізнаємося все більше про нові гібридні таксони, які існували до цього, завдяки покращенню молекулярних методів, проте, їхня кількість (таксонів гібридного походження) не зростає завдяки цим методам.*

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 доповнена ілюстраціями результатів під час роботи із різними методами, що показує рівень володіння описаними методиками. В роботі було використано 15 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? Чи не краще було б уніфікувати кількість особин, із кожної водойми, для кожного із використаних методів? Також, цікавою є географія дослідження, яким чином відбирали локалітети для аналізу?

Третій розділ присвячено оцінці методів ідентифікації таксономічної приналежності, плідності та геномної композиції зелених жаб.

Одним із перших методів, які розглянуті Анною Олегівною в цьому розділі, є аналіз діагностичності криків вивільнення зелених жаб із висновком, що крики вивільнення не можуть слугувати видоспецифічним маркером для визначення таксономічної приналежності різних видів зелених жаб роду *Pelophylax*. Цікаво, чи припускає здобувачка ймовірність зміни висновків за умови аналізу більшої вибірки із уніфікованою кількістю особин, використаних при аналізі?

При описі нової методики прижиттєвого визначення плідності пуголовків для аналізу відбирали саме регеновану тканину хвостовго плавника (ст. 78-79). Чи правильно я розумію, що первинну тканину плавника до аналізу не брали? І якщо так, тоді наступне запитання, чому саме?

З чим може бути пов'язана велика кількість аномалій у зелених жаб відібраних із Добрицького ставу? В тексті, на сторінці 84, йдеться про 30 таких особин а в таблиці 3.7, на сторінці 86, в загальній кількості таких особин вписано 34 особини. В будь-якому випадку на вибірку 190 (таблиця 3.6) особин це чимала кількість аномалій. Чи перевіряли хімічний склад водойм і чи досліджувала здобувачка паразитів зелених жаб із цих локалітетів?

Четвертий розділ присвячено дослідженні особливостей гаметогенезу різних форм зелених жаб. У першій частині розділу Анна Олегівна аналізує розмірний розподіл сперматозоїдів та визначення плідності сперми за розміром сперматозоїдів. Проаналізувавши 1362 мейотичних хромосомних пластинок здобувачка спростовує залежність довжини голівок сперматозоїдів від мейотичних хромосом в сім'яниках. Також з важливих висновків розділу можна виділити те, що вимірювання розмірів сперматозоїдів не може бути надійним методом для ідентифікації самців, що потенційно продукують диплоїдні гамети.

Наступна частина розділу розкриває різноманіття геномів, що передаються в різних ГПС. В таблиці 4.2 “Характеристика всіх проаналізованих самиць *P. esculentus*”, як на мене, бракує інформації по локалітетах відбору кожної самиці. Варто також додати, що вибірки є дещо малими, про що також говорить Анна Олегівна, тому не можна робити висновки щодо характеру спадкування в R-E-ГПС.

П'ятий розділ описує використання запропонованих методів для встановлення особливостей відтворення гібридів в природних ГПС. Анна Олегівна описує визначення складу ГПС Іського ставу. Далі здобувачка детально описує визначення таксономічної приналежності за допомогою аналізу мікросателітних послідовностей 55 особин. Цікаво, чому не було проведено аналізу популяційної структури з використанням баєсівської статистики, наприклад, *NewHybrids* чи подібні інструменти, або ж з допомогою R? Далі здобувачка обговорює ймовірні клональні лінії “Мультилокусним генотипом називається набір ідентичних алелів в мікросателітних локусах. Невелика кількість комбінацій та висока їх

частота може бути ознакою наявності клонального відтворення.”, тому в цьому контексті хотіла б уточнити *чи перевіряли мікросателітні локуси на групи зчеплення?*

На сторінці 115 Анна Олегівна пояснює алгоритм обчислень значення «ймовірності ідентичності» і описує, що для цього було додано особин жаби озерної із двох інших локалітетів, а саме Кремінної та Брусівки. *Чи є, на думку здобувачки, доцільним об'єднання трьох локалітетів із потенційно різними частотами трапляння мікросателітів, які аналізуються, в одну вибірку?* Як на мене, це досить ризикований крок, оскільки частоти трапляння в межах різних ГПС, навіть для одного виду, можуть значно відрізнятись.

Далі Анна Олегівна дискутує щодо відтворення триплоїдних гібридів в R-Erf-ГПС. У водоймі Брусівки виявлено надзвичайно цікаву ГПС. Опис є зрозумілим та чітким, хотіла б уточнити тільки *чи вдалося доростити пуголовки, від цих пар, які описані в підрозділі, до етапу відмирання?* *Чи все ж схрещування було проведено виключно для описаного аналізу?*

Останній підрозділ прив'язано оцінці ефективності методів аналізу ГПС, використаних в дисертаційному дослідженні, з основним висновком, що найбільш надійними у визначенні складу ГПС є молекулярні або цитогенетичні методи. Важливою є таблиця 5.7 де конденсовано подана інформація, щодо кожного із методів із оцінкою доступності та зручності методів, яку разом із рисунком 5.5, потенційно, можна використовувати як для навчальних курсів, так і в розробці дизайнів експериментів.

Висновки сформувані із 7 пунктів, які є логічними та обґрунтованими і впливають із самого змісту роботи Анни Олегівни.

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 Федорової Анни Олегівни “Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *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 Федорова Анна Олегівна 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: 16:06:01 26.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук_Струс_на_Федорову_А.О.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 139.7 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Відгук_Струс_на_Федорову_А.О.pdf
Розмір файлу без підпису: 138.4 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): 16:06:00
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 Анатолію БОЖКОВУ
Майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022

ВІДГУК

офіційного опонента, в.о. проректора з науково-педагогічної роботи у сфері міжнародного співробітництва, доцента кафедри загальної біології та водних біоресурсів Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, кандидата біологічних наук ГАСО Віктора Яковича на дисертаційну роботу Анни Олегівни ФЕДОРОВОЇ «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus complex*», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми. Зелені жаби *Pelophylax esculentus complex* є надзвичайно цікавими з точки зору еволюційної біології «нестандартних» гібридогенних процесів у тварин. Цей комплекс складається з геміклонального гібрида *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) та двох батьківських видів: *P. lessonae* (Camerano, 1882), генотип LL, та *P. ridibundus* (Pallas, 1771), генотип RR. Усі вони можуть утворювати генотипово різні геміклональні популяційні системи (ГПС). На утворення та підтримання складу різних ГПС може впливати різноманітний комплекс факторів: від передавання різних батьківських геномів в гаметах гібридів до вибіркової смертності різних форм. Не зважаючи

на активні дослідження останнього десятиріччя у цьому напрямку, складні механізми відтворення та підтримання складу різноманітних типів ГПС недостатньо визначені, що вимагає розробки нових методологічних підходів та удосконалення таких, що вже існують.

Об'єкт досліджень. Об'єктом досліджень є методи дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*.

Предмет досліджень. Предметом досліджень є різноманіття та оцінка ефективності методів дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*, в тому числі цитологічних, молекулярних, цитогенетичних та етологічних, а також практичне застосування цих методів.

Мета і завдання роботи. Метою роботи є розширення комплексу методів встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex. Для досягнення цієї мети здобувачем поставлено сім задач, які спрямовані на визначення біоакустичного аналізу криків жаб, прижиттєвого визначення плоідності пуголовків та аномалій розвитку, використання цитометрії еритроцитів для детекції триплоїдних гібридів, вимірювання розмірів сперматозоїдів для визначення їх плоідності, використання комплексу морфологічних, гібридологічного, молекулярних та цитогенетичних методів, запропонування комплексу методів для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено та апробовано нові методив дослідження зелених жаб роду *Pelophylax*. Розроблено новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків, оцінено ефективність використання біоакустичного аналізу криків вивільнення, цитометрії еритроцитів та цитометрії сперматозоїдів для визначення таксономічної приналежності та/або плоідності особин та їх

гамет. Отримано нові дані, що стосуються особливостей підтримання складу декількох ГПС через вибірккову смертність частини потомства.

Практичне значення отриманих результатів. Опрацьовані методи дослідження зелених жаб, модифікація та апробація нових методів дозволить ефективно досліджувати різноманіття зелених жаб. Розроблений новий метод прижиттєвого отримання хромосомних препаратів пуголовків може бути адаптований до використання у дослідженнях інших видів амфібій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами. Мікросателітний та біоакустичний аналіз у роботі виконаний за грантом Slovak Academic International Agency (номер гранту 1/0286/19) та Researchers at Risk Fellowship від Чеської Академії Наук (номер гранту RRFU-22-20).

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковано чотири статті в журналах, що індексуються в Scopus та/або Web of Science (один журнал в Q2 і три журнали в Q3, за SCImago Journal and Country Rank) та 3 статті у фахових наукових виданнях України та ще дві статті у закордонних наукових виданнях.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження цілком достатньо представлені у доповідях та опублікованих тезах доповідей на багатьох наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 207 сторінках, містить анотацію, основну частину, список використаних джерел (227) та 10 додатків. Основна частина складається з таких частин: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати та обговорення (три розділи) і висновки, та викладена на 118 сторінках тексту. Дисертація містить 32 ілюстрації та 19 таблиць.

Розділ 1 «Огляд літератури» присвячений аналізу наявної наукової літератури за темою дисертації та розкриває питання гібридогенезу та геміклонального успадкування у зелених жаб, методологічним підходам до вивчення їхнього різноманіття (таксономічної приналежності, цитометрії еритроцитів, аналізу каріотипу, флуоресцентній гібридизації *in situ*, аномаліям розвитку зелених жаб, визначенню геномів у гаметах тощо).

Розділ 2. «Матеріали і методи дослідження» надає ретельний опис польових та лабораторних методів, які були використані для проведення дисертаційного дослідження. Обсяг матеріалу (>1200 представників *Pelophylax esculentus complex*), його географія (Харківська, Донецька, Луганська, Київська, Чернігівська та Волинська області України), використані сучасні молекулярно-генетичні досліджень та адекватні статистичні методи аналізу даних забезпечили валідність отриманих результатів і висновків.

Розділ 3. «Оцінка методів ідентифікації таксономічної приналежності, плоїдності та геномної композиції зелених жаб» описує нові підходи до визначення зелених жаб за біоакустичним аналізом, новий метод прижиттєвого визначення плоїдності пуголовків, порівняння різних форм зелених жаб за стійкістю їх розвитку та відповідними аномаліями, описує можливість використання розмірів еритроцитів для оцінки плоїдності тощо.

Розділ 4. «Дослідження особливостей гаметогенезу різних форм зелених жаб» присвячений аналізу розмірного розподілу сперматозоїдів та визначенню плоїдності сперми за їхнім розміром. Також у розділі описано різноманіття геномів, які передаються в різних геміклональних популяційних системах.

Розділ 5. «Використання запропонованих методів для встановлення особливостей відтворення гібридів в природних ГПС» присвячений важливим здобуткам дисертаційного наукового дослідження. У цьому розділі предметно описано результати досліджень щодо відтворення гібридів у геміклональних популяційних систем Іськова ставу та відтворення триплоїдних гібридів в R-Erf-ГПС, смертність пуголовків в R-E-Ep ГПС Нижнього Добрицького ставу, а головне – оцінено ефективність методів аналізу геміклональних популяційних систем, які здобувачка застосовувала у своєму дисертаційному дослідженні.

Висновки дисертації узагальнюють основні результати досліджень, налічують сім пунктів, кожен з яких розкриває одну з задач дослідження, які були поставлені перед здобувачкою при постановці мети та плануванні виконання дисертаційної роботи.

Робота виконана без порушення біоетичних норм проведення експериментальних робіт з тваринами.

Питання, зауваження та рекомендації до дисертаційної роботи.

1. Деякі представлені первинні дані все ж таки краще переносити у Додатки, як, наприклад, таблиця 4.1, де наводяться дані стосовно кожної окремої особини, що досліджувалася за наведеним параметром.
2. Методично не зовсім доречним виглядає також додатковий опис кількості виловлених та оброблених особин жаб в основній частині роботи, так же, як і вказування на те, що дисертантка особисто приймала участь у відлові жаб з Іськова ставу (с. 111).
3. Вельми цікавим є дослідження активності лактатдегідрогенази в ооцитах жаб різних ГПС. Різницю в активності R та L алозимів ЛДГ-

1 здобувачка пояснює різницею в способі життя жаб з генотипами RR і LL, та потребі у більш активному метаболізмі для *P. ridibundus*, які мають більшу спорідненість з водним середовищем, через що вони можуть сильніше страждати від гіпоксії (с. 110). Цікаво було б дізнатися точку зору здобувачки на причинно-наслідкові зв'язки, які привели її до цього висновку. Без додаткових пояснень залежність «гіпоксія → потреба в активному метаболізмі» не виглядає очевидним. Відомо, що ЛДГ-1 міститься переважно в цитоплазмі міокардіоцитів і, на перший погляд, активний метаболізм в умовах гіпоксії навряд є сприятливим для виживання.

4. Важливим здобутком авторки вважаю ретельний аналіз отриманих даних та створення зведеної таблиці «Оцінка ефективності методів дослідження ГПС» (с. 135), а слідом й запропонованого комплексу методів для повної оцінки складу і характеру відтворення ГПС у вигляді схеми послідовних дій. Однак, якщо вважати цю схему рекомендацією для інших дослідників, бажано було б уточнити, чи є в неї взаємозамінні чи необов'язкові або, навпаки, обов'язкові компоненти в залежності від завдання дослідження. Дещо з цього наводиться у тексті розділу, але хотілося б побачити чіткі рекомендації відповідно до запропонованої схеми.
5. У Висновку 1 вказано, що «Таким чином, крики вивільнення не можуть слугувати видоспецифічним маркером». Цей висновок потребує уточнення. Саме «видоспецифічним» за значенням цього терміну, виходячи з тексту роботи, він і є, тому що крики самців чітко розділяються на групи *ridibundus* та *lessonae* (с. 69). Так, крики вивільнення не виявили відмінностей між криками батьківського виду та гібридів (обох статей), а також диплоїдів та триплоїдів, але ж для «чистих» видів відмінності є.

6. Текст роботи містить деякі помилки та невдалі речення. Представлені зауваження не знижують загальну якість і наукову цінність дисертаційної роботи.

Висновок щодо дисертаційної роботи. На підставі проведеного аналізу тексту дисертації вважаю, що кваліфікаційна наукова робота Федорової Анни Олегівни на тему «Розширення підходів до встановлення складу природних геміклональних популяційних систем гібридогенного *Pelophylax esculentus* complex» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, теоретичною і практичною цінністю, науковою новизною, достовірністю одержаних результатів, обґрунтованістю висновків, оформленням роботи 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 Федорова Анна Олегівна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент:

В.о. проректора з науково-педагогічної роботи
у сфері міжнародного співробітництва,
доцент кафедри загальної біології та
водних біоресурсів
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара,
кандидат біологічних наук, доцент

Віктор ГАСО

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 17:19:27 26.01.2024

Назва файлу з підписом: Відгук Гассо _на ФЕДОРОВА А.О.pdf.asice

Розмір файлу з підписом: 226.5 КБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Відгук Гассо _на ФЕДОРОВА А.О.pdf

Розмір файлу без підпису: 263.3 КБ

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

Підписувач: Гассо Віктор Якович

П.І.Б.: Гассо Віктор Якович

Країна: Україна

РНОКПП: 2477400371

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 17:19:24 26.01.2024

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

Серійний номер: 382367105294AF970400000002AC1E006E12E801

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