

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Шайкевич Елены Владимировны «Генетическая идентификация близкородственных видов насекомых и роль симбионтов в их эволюции (на примере комплекса видов *Culex pipiens* и *Adalia* spp.)», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Систематика и эволюция – две области современной биологии, настолько тесно связанные друг с другом, что исследования в одной из них невозможны без глубокого и тщательного анализа результатов с позиций другой. И в особенности это касается исследований, посвященных систематике и особенностям эволюции близкородственных видов. Долгое время считалось, что эволюционный процесс носит линейный характер, и если исследователь сталкивается с частично изолированными формами, или подвидами, то это – некий этап видообразования, неизбежно ведущий к обособлению этих форм до статуса независимых видов. Однако в настоящее время все больше фактов, свидетельствующих, что такие формы могут образовывать «сети» популяций, устойчиво существующих в относительно постоянных условиях на протяжении неопределенно долгого времени. И в связи с этим особенно остро встает вопрос о понятии «вид» - насколько строгими должны быть изолирующие барьеры между ним и родственными видами, каким может быть допустимый поток генов, не «размывающий» генофонд данного вида, и что вообще представляет из себя видоспецифический генотип, его статусные признаки, и их реализация в фенотипе – морфологических, физиологических и поведенческих особенностей, адаптациях. И наконец, какие механизмы участвуют в формировании и поддержании всего наблюдаемого многообразия форм, и можно-ли дифференцировать их как поддерживающие разнообразие на видовом уровне и формирующие изоляцию на межвидовом.

Представленная работа Елены Владимировны Шайкевич посвящена проблеме систематики и эволюции близкородственных видов, и с моей точки зрения, вносит существенный вклад в понимание эволюционных механизмов формирования и поддержания внутри- и межвидового разнообразия. С практической точки зрения, эта работа дает ключ к диагностике близкородственных видов комаров и разных форм одного вида, что важно для оценки эпидемиологической роли этих форм и видов в распространении трансмиссивных заболеваний человека и животных. Таким образом, актуальность заявленной темы не вызывает сомнений.

Работа проведена на группе видов двукрылых рода *Culex* и жуков рода *Adalia*, на представительном объеме выборок, собранных с Евразийского и Африканского ареала оби-

тания комаров и Евразийского ареала обитания божьих коровок. Обе группы видов соответствуют цели и задачам исследования, представляя собой сложную сеть морфотипов и таксонов подвидового и видового уровней, обладающих значительным полиморфизмом статусных морфологических признаков и молекулярных маркеров, и имеющих разную степень изоляции между собой. Бактериальные симбионты данных видов имеют различное распространение у разных форм, специфические корреляции с конкретными гаплотипами, и обеспечивают разную степень изоляции представителей разных видов, подвидов и морфотипов. Детальный анализ закономерностей распределения видовых и подвидовых маркеров, их связи с бактериальными симбионтами и эффективностью изолирующих барьеров представляется принципиальной задачей для оценки микроэволюционных процессов, определяющих наблюдаемую картину распространения видов по ареалу обитания. В своей работе автор последовательно приводит морфологические и физиологические характеристики особей из изученных выборок, оценивает их изменчивость по ядерным и митохондриальным молекулярным маркерам, наличие и изменчивость штаммов внутриклеточных бактериальных инфекций/симбионтов, и на основании собственных и литературных данных определяет их таксономическое положение и ведущие генетические механизмы поддержания изменчивости на популяционном и видовом уровнях. Диссертация занимает 223 страницы текста, включает 361 литературный источник, проиллюстрирована 30-ю рисунками и 24-я таблицами.

Работа открывается «Обзором литературы», составляющим около ее половины. Обзор разделен на три части, в которых Елена Владимировна проводит тщательный анализ истории изучения и существующих на сегодняшний день проблем в определении таксономического ранга, оценках ареала распространения и изменчивости объектов исследования. Первая часть обзора посвящена биологии и генетике комаров рода *Culex*. Особое внимание Елена Владимировна уделяет видам комплекса *Culex pipiens*, демонстрируя их неустойчивое систематическое положение и высокий полиморфизм у видов данного комплекса таких сложных физиологических признаков, как автогенность, стеногамность и способность к диапаузе. Тщательно описана биология видов комплекса *Culex pipiens*, их систематически значимые морфологические признаки, экологические и пищевые предпочтения, роль в переносе патогенов. Детально описаны молекулярные маркеры видов и морфотипов данного комплекса, показаны проблемы их применения, связанные с перекрывающимся полиморфизмом маркеров у родственных видов, их интрогрессией в геном родственных видов в зонах гибридизации, и различной выраженностью этих явлений в разных частях ареала распространения видов. Можно сделать следующие выводы из этой части обзора: многообразие морфотипов связано с набором ключевых адаптаций, позволяющих данному морфотипу занять определенную нишу; изолирующие барьеры во многих случаях несовершенны, что вызывает эффект «пори-

стого генома», когда полученные в результате интрогрессии нейтральные маркеры из «чужого генома» могут поддерживаться в популяционном генофонде неопределенно длительное время; ключевые адаптации морфотипов закрепились в разной степени в разных частях ареала обитания каждого данного морфотипа, что приводит к значительным колебаниям эффективности изолирующих барьеров и доминантности физиологических признаков при гибридизации одних и тех же морфотипов из разных гибридных зон. Отмечено также, что главным фактором кластеризации митохондриальных гаплотипов комаров является не таксономическая близость, а наличие внутриклеточного симбионта *Wolbachia*.

Анализ литературы, посвященной биологии и генетике представителей рода *Adalia*, во второй части обзора, позволяет сделать сходные выводы об особенностях эволюции близкородственных видов божьих коровок. Несмотря на то, что в целом эти виды изолированы лучше, возможность гибридизации между наиболее близкими формами (например, между *A. bipunctata* и *A. b. fasciatopunctata*) и отсутствие между ними отличий по некоторым молекулярным маркерам также предполагает возможность горизонтального переноса и фиксации аллелей между видами с неполной репродуктивной изоляцией. Подтверждается также связь эндосимбионтов с некоторыми митохондриальными гаплотипами. Третья часть обзора посвящена бактериальным эндосимбионтам комаров и божьих коровок, истории их открытия, распространенности, влиянию на физиологию хозяина и молекулярно-генетическим механизмам контроля физиологических функций, а также горизонтальным и вертикальным механизмам передачи симбионтов. Детально описано явление цитоплазматической несовместимости, вызываемое присутствием эндосимбионта и приводящее к одно- или двусторонней несовместимости в скрещиваниях линий хозяев с различными штаммами эндосимбионтов или при инфицированности только одного из партнеров. Обсуждается возможное адаптивное значение для организма-хозяина заражение его бактериальными эндосимбионтами, проявляющееся как через прямое повышение компонент приспособленности - плодовитости, устойчивости к паразитам и патогенам, так и через популяционные механизмы «избавления от лишних конкурентов» и предоставление «стартового» пищевого бонуса для видов, характеризующихся родственным каннибализмом. Все эти перечисленные признаки позволяют считать эндосимбионтов потенциальным мощным эволюционным фактором, одновременно изолирующим своих носителей от неинфицированных, и при этом предоставляющим им адаптивное преимущество. Таким образом, цели и задачи исследования детально обоснованы.

Использованный автором солидный материально-методический аппарат адекватен поставленным задачам и представляет собой набор современных методов молекулярной диагностики и программ и открытых информационных ресурсов для проведения биоинформа-

ционного анализа. В данном разделе следовало упомянуть также методы классической систематики, используемые в работе для диагностики природных сборов и экспериментального материала.

Глава «Результаты» представлена двумя разделами, посвященными анализу эволюционной изменчивости комаров комплекса *Culex pipiens* и божьих коровок рода *Adalia*. Представляя результаты анализа эволюционной изменчивости комаров комплекса *Culex pipiens*, Елена Владимировна приводит описание изменчивости морфологических и физиологических признаков, характеризующих исследованные природные популяции, степени их инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia*, и полиморфизма по фрагменту митохондриальной цитохромоксидазы I. Отмечая высокий полиморфизм популяций по перечисленным признакам и сложность однозначной идентификации видов, автор представляет далее результаты детального анализа материала сборов, позволяющего однозначно определить видовой состав и характеристики видов и морфотипов изучаемых комаров. Используя 5'- и 3'- фрагменты митохондриального гена *COI* Елена Владимировна разработала методы однозначного определения видов *C. p. pipiens* (f. *pipiens* и f. *molestus*), *C. p. quinquefasciatus*, *C. p. pallens*, *C. torrentium* комплекса *C. pipiens*, *C. modestus*, основанные на подходе ПЦР-ПДРФ. Применение этих методов к популяционным сборам и сопоставление результатов с оценками физиологических признаков и с данными по определению маркеров *Wolbachia* показало, что *C. torrentium* и *C. p. pipiens* из природных популяций имеют одностороннюю цитоплазматическую несовместимость, обусловленную инфекцией *Wolbachia* вида *C. p. pipiens*, и горизонтальный перенос вольбахии между *C. pipiens* и *C. torrentium* невозможен. Инфекция *Wolbachia*, предположительно, играет ключевую роль и в расхождении видов *C. pipiens* и *C. torrentium*. Морфотип "*molestus*" полиморфен по признаку автогенности, тогда как морфотип "*pipiens*" исключительно неавтогенен. В открытых биотопах оба морфотипа способны образовывать смешанные популяции, как и "*pipiens*" с *C. torrentium*, тогда как популяции "*molestus*" с *C. torrentium* не обнаружены. Гаплотипы зараженных *Wolbachia* видов комплекса *C. pipiens* обеднены по сравнению с гаплотипами свободного от инфекции вида *C. torrentium*, и для *C. p. pipiens* f. *molestus* имеют общее недавнее происхождение, для всех популяций данной формы. Было также обнаружено явление гетероплазмии в популяциях *C. torrentium*, и показано, что его происхождение связано с передачей отцовского митохондриального гаплотипа.

Оценка изменчивости области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) кластера генов рРНК показала близкое родство комаров формы *molestus* из разных географических локальностей, и неприменимость данной последовательности вследствие ее высокой вариабельности для диагностики комаров *C. p. pipiens*. Анализ изменчивой после-

довательности межгенного спейсера кластера генов рибосомной РНК потребовал от автора амплификации, клонирования, секвенирования и детальной характеристики изменчивости фрагмента длиной около 2,5 тыс. п.н. Была показана роль микросателлитов в формировании изменчивости, и найдены фрагменты мобильных элементов, встраивание и вырезание (или рекомбинационное удаление) которых, очевидно, вносило свой вклад в формирование изменчивости данной области. Кладистический анализ выявленных гаплотипов показал высокий полиморфизм *C. p. pipiens f. pipiens* по молекулярным ядерным маркерам. При этом морфотип "*pipiens*" из южно-российской популяции кластеризуется с *C. p. pipiens f. molestus*, что является доказательством происходящего обмена генетической информацией в южных российских популяциях комаров.

Елена Владимировна показала ведущую роль бактериальной инфекции в закреплении новых митохондриальных гаплотипов. Детальный анализ изменчивости бактерии *Wolbachia* по генам *pk1* и *ank2*, достаточным для типирования штаммов, показал строгое соответствие типов бактериальной инфекции и родительских видов и форм. Более того, последовательности эволюционных событий, связанных с дивергенцией гаплотипов, показанных для бактериального генома, и митотипов комаров-хозяев, идентичны.

Детализируя и проверяя возможную последовательность эволюционных событий, Елена Владимировна предприняла масштабное исследование популяций комаров комплекса *C. pipiens* по трансекте север-юг через Евразийскую и Африканскую часть ареала обитания данных видов. Предполагая, что такие ключевые адаптации, как способность к диапаузе и стеногамность возникают постепенно, по мере продвижения вида на север, было полезно сравнить виды и морфотипы, обладающие альтернативными признаками, по изменчивости митохондриальных гаплотипов, определить возможность гибридизации в природе между формами с разной степенью филогенетической близости, и оценить зоны гибридизации. Приведенные результаты подтверждают, что север Африки и вся зона Средиземноморья представляют собой ареал обитания большинства митотипов, тогда как в зоне тропиков распространены исключительно митотип Е, а в зоне умеренного климата и севернее – митотипы А, В, С и D. Учитывая возможность образования смешанных популяций в местах перекрытия ареала, а также совместного обитания в открытых биотопах стеногамных и эвригамных форм в зоне субтропиков, можно ожидать наличие зоны гибридизации именно в регионе Средиземноморья. Сопоставляя таксономический статус митохондриальных и ядерных маркеров у индивидуальных образцов автор демонстрирует наличие интрогрессии в средиземноморских популяциях и убедительно показывает существование в данном регионе гибридизации между подвидами или формами, частота которой зависит от степени филогенетической близости форм. Этот факт согласуется и с представлениями о временной и простран-

ственной неравномерности накопления изменчивости, определяющей как ключевые адаптации форм к условиям обитания, так и «прочность» изолирующих барьеров между формами. Автор показывает резкое снижение частоты гибридизации между формами *pipiens* и *molestus* в России и Германии, предполагая, что несколько отмеченных единичных случаев могут быть связаны не с интрогрессией, а с независимо возникшими аллелями по микросателлитным локусам. С моей точки зрения, это маловероятно, принимая во внимание различие в 50 п.н. между аллелями, 2-х – 3-х –нуклеотидные микросателлитные повторы и отсутствие переходных форм, которые должны сохраняться в популяции в случае относительно недавнего происхождения гаплотипа. Здесь возможно и иное объяснение – учитывая огромную численность популяций комаров, и нейтральность используемых молекулярных маркеров, в соответствии с концепцией «пористого генома» можно ожидать длительное сохранение в ядерном геноме «следов» от предковых гибридизаций, осуществлявшихся в районе Средиземноморья.

Представляя результаты анализа микроэволюционных процессов в популяциях божьих коровок комплекса *Adalia bipunctata*, Елена Владимировна обращается в первую очередь к связи полиморфизма митохондриальной цитохромоксидазы *COI* с бактериальными инфекциями адалий. Как и у комаров, у божьих коровок наличие эндосимбионта резко снижает разнообразие митохондриальных гаплотипов: средние нуклеотидные различия между жуками в зараженных и незараженных выборках составили 0,002 и 0,021 замен на сайт соответственно, и относительное количество гаплотипов у зараженных особей было снижено. Причем разные инфекции связаны с разными мт-гаплотипами: спироплазма характерна для гаплотипа 1 и его производных, риккетсии обнаружены у особей с митотипами 9 и 10. Широкая распространенность по ареалу обитания адалий данных инфекций, ассоциированных со строго определенными митотипами, позволяет автору заключить, что инфекции передаются вертикальным путем, т.е. потомству инфицированных особей, и имеют древнее происхождение. Это также свидетельствует в пользу адаптивной ценности эндосимбионта для хозяина и генетической коадаптации их геномов.

Детальный анализ митохондриальных гаплотипов позволил выявить 17 митотипов, 10 из которых автор описал впервые, и охарактеризовать популяции различных форм адалий по генетической структуре. Этот анализ показал почти полное перекрытие изменчивости у форм *Adalia bipunctata*, *A. fasciatopunctata*, *A. reuelierei* и *A. turanica*, на основании чего их следует считать географическими формами политипического вида *Adalia bipunctata*. Видовой статус *A. tetraspilota* и *A. decempunctata* подтвержден существенными различиями по генетической изменчивости митохондриальных гаплотипов. Особенно интересен факт, что в популяциях *Adalia bipunctata* присутствуют два уникальных гаплотипа H9 и H10, ассоцииро-

ванные исключительно с риккетсией, генетические дистанции которых до остальных гаплотипов данного вида соответствуют статусу видовых. Используя ядерные молекулярные маркеры по области ITS2, Елена Владимировна показала отсутствие внутривидовой изменчивости по ядерным маркерам у особей с разными митотипами, что несомненно доказывает их принадлежность одному виду. Митотип H9 наиболее близок соответствующему фрагменту митохондриального гена *COI* у вида *A. frigida*, хотя и не показывают строгого соответствия. Автор выдвигает вполне обоснованное предположение, что данный гаплотип возник в результате древней интрогрессии митохондриального генома предкового вида *A. frigida* в предковый вид *A. bipunctata*. Видовой статус вида *A. frigida* подтвержден анализом нуклеотидных последовательностей *COI* и ITS2. Этот раздел следует за разделом о древних митохондриальных гаплотипах в генофонде *Adalia bipunctata*, хотя логичнее было расположить его раньше. Также отметим, что видовой статус форм адалии обсуждается в двух разделах – 3.2.4 и 3.2.8, посвященных полиморфизму митотипов и непосредственно видовому статусу близких морфотипов адалии, и которые можно было объединить. Тем не менее, это несущественное замечание, так как по логике представления материала автор старалась придерживаться единообразия для обоих разделов главы «Результаты».

В связи с изложением материала по микроэволюционным процессам у видов и подвигов комаров *Culex* замечу слишком тезисное представление данных по полиморфизму митохондриальных гаплотипов в южных популяциях комаров. При обилии материала, представленного автором, этот раздел мог быть значительно представительнее. И в отношении древности митотипов, обсуждаемых автором в данном разделе, замечу, что древность митотипов E и E1 (дополнительно к обсуждаемым автором митотипам A, B и C) может быть обоснована как наличием вариабельных сайтов, даже в большем количестве, чем у упомянутых митотипов A, B и C, так и естественным распространением митотипов E и E1 в зоне первичного формирования признака стеногамии, которым обладают представители данного митотипа.

В отношении адаптивной значимости влияния эндосимбионта риккетсии на приспособленность хозяина адалии автору следовало подчеркнуть, и даже вынести в выводы хороший аргумент о древности данных симбиотических отношений, связанный с собственно древностью митотипа H10, ассоциированного с риккетсией, что показано в данной работе.

Завершает работу обширное обсуждение, в котором дана сравнительная оценка общих и различающихся популяционных и микроэволюционных процессов у таксонов *Culex* и *Adalia*. Приведены данные по различиям скоростей накопления мутаций в разных последовательностях у видов рода *Culex* и рода *Adalia*; выявлены сходные оценки по степени дивергенции таксонов разного ранга в обоих комплексах видов, полученные на основе изменчивости митотипов; показано сходство полученных оценок и принятых на настоящий момент в

мире по данным мета-анализа, проведенного Ю.Ф.Картавцевым. Бóльшая обособленность видов рода *Culex* по ядерной ДНК связана с эффектами цитоплазматической несовместимости под влиянием эндосимбионта *Wolbachia*. Приведенные сравнительные оценки влияния эндосимбионтов в обоих комплексах видов на полиморфизм мтДНК показывают идентичные эффекты – строгую корреляцию типа бактерии и митохондриального гаплотипа хозяина, и обеднение митотипов у инфицированных видов/подвидов/морфотипов. Последний эффект автор связывает не только с формированием несовместимости инфицированного гаплотипа с другими, но и с адаптивным преимуществом симбиотических отношений, приводящих к распространению связанных с эндосимбионтом мт-гаплотипов и уменьшению разнообразия мтДНК в зараженных симбионтами популяциях.

Обсуждая географические закономерности в распространении мт-гаплотипов *Culex* и *Adalia*, Елена Владимировна отмечает принципиальную разницу в биогеографии видов рода *Culex* и рода *Adalia*. Распределение мт-гаплотипов *Culex pipiens* демонстрирует выраженную географическую ориентацию, строго обусловленную биологией видов, адаптациями к условиям питания и размножения, особенностями и эволюционной последовательностью формирования изолирующих барьеров, вызванных цитоплазматической несовместимостью. Виды *Adalia* не демонстрируют закономерностей в географическом распространении как мт-гаплотипов, так и симбиотических бактерий у *Adalia*, что предположительно связано со сходным набором адаптаций у форм и видов данной группы, случайным «эффектом основателя» при распространении видов и общим набором эндосимбионтов и ассоциированных с ними гаплотипов.

Явление интрогрессии митохондриального генома у родственных видов, наблюдаемое в зонах симпатрии, или зонах гибридизации, наблюдается у обеих групп видов, хотя и выражено слабее у адалий. Елена Владимировна обсуждает неодинаковую вероятность гибридизации в разных географических зонах ареала обитания вида, возможные сценарии формирования новых мт-гаплотипов, распространения гибридов и расширения зон гибридизации. Отмечая значимость интрогрессии для понимания фундаментальных эволюционных процессов, Елена Владимировна подчеркивает также важность применения ядерных маркеров для идентификации видов в зонах гибридизации, где фенотип организма может определяться ядерным геномом, а митохондриальный нести типичные признаки близнецового вида. Для исследуемых видов автором исследованы маркерные последовательности и разработаны методы строгой идентификации таксонов разного ранга.

Выводы работы хорошо согласуются с полученными результатами и соответствуют поставленным задачам.

Представленная работа выполнена на солидном фактическом материале, строго обоснована, убедительно аргументирована и не имеет серьезных возражений по существу. Отмеченные погрешности ни в коей мере не умаляют общего значения данной работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и тщательно оформлен и прекрасно проиллюстрирован.

Е.В. Шайкевич выполнено новое фундаментальное эволюционное и популяционно-генетическое исследование. На примере близкородственных групп видов комаров и божьих коровок продемонстрированы механизмы формирования сложной системы таксонов видового и подвидового ранга, определена роль бактериальных симбионтов в формировании генетического разнообразия форм и изолирующих барьеров между ними, показана значимость явления митохондриальной интрогрессии между видами и уточнен видовой статус морфологически трудно различимых форм. Разработанные методы идентификации видов комаров имеют важное прикладное значение для эпидемиологических исследований.

Результаты работы широко апробированы в публикациях и на научных конференциях. В целом, работа Е.В. Шайкевич представляет значимый вклад в познание популяционно-генетических закономерностей биологической эволюции.

Работа Е.В. Шайкевич полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, и ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент
Куликов Алексей Михайлович
Доктор биологических наук,
Зам. директора Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
Заведующий лабораторией эволюционной генетики развития
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26
Телефон: +7(499) 135-87-81, e-mail: amkulikov@gmail.com

Подпись А.М. Куликова заверяю:
Ученый секретарь ИБР РАН


24.02.2015

/Е.В. Абрамова