

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Рыскова Алексея Петровича,

доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАН

на диссертационную работу 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.

### Актуальность исследования.

Проблема создания таксономической системы, адекватной процессу эволюции, является одной из важнейших в современной биологии наук о жизни. Ключевое звено решения этой проблемы – изучение процессов видообразования. В таксономии существуют две значимые проблемы, требующие внимания и решения, которые связаны либо с морфологическим сходством представителей разных видов, либо морфологической изменчивостью в пределах одного (политипического) вида. Эти проблемы возникают и при изучении таксономии и видообразования насекомых. Для них, кроме того, показан феномен симбиоза с внутриклеточными бактериями, которые могут изменять скорость популяционной изоляции и внутривидовой дивергенции инфицированных хозяев.

Елена Владимировна занимается указанными проблемами на протяжении многих лет и использует в качестве модельных объектов исследования комплексы близкородственных видов и внутривидовых форм представителей двукрылых (комары комплекса *Culex pipiens*) и представителей жесткокрылых (божьи коровки рода *Adalia*). Существуют большие трудности с идентификацией представителей таких комплексов, как *Culex pipiens*, состоящих из популяций различной эпидемиологической значимости, которые при этом трудно различимы морфологически. Кроме того они включают ряд близких видов и подвидов политипического вида, заселяющих одни и те же территории, и которые могут давать жизнеспособное потомство при



скрещивании. До сих пор дискуссионным остается таксономический статус многих форм этого комплекса.

Представители рода *Adalia* наоборот характеризуются громадным разнообразием морфологических признаков в пределах видов и даже в пределах популяций, включающих различающиеся типы. Известны также популяции или подвиды, образующие, например, политипический вид *A. bipunctata*. В целом таксономический статус многих этих форм остается невыясненным.

Явление симбиоза (заражение внутриклеточными бактериями), известно для большинства видов насекомых, в том числе, комаров и божьих коровок, является дополнительным фактором эволюции, оказывая различные эффекты для разных видов-хозяев. Очевидно, это усложняет проблемы таксономической систематики и требует новых генетических и эволюционных исследований самих симбионтов и их хозяев.

Перечисленные проблемы и определяют актуальность исследования Е.В. Шайкевич, основной целью которой являлась идентификация близкородственных видов насекомых с неясным таксономическим статусом на моделях комплексов *Culex pipiens* и *Adalia bipunctata*, выяснение генетических процессов, протекающих в этих популяциях, и роли симбиотических бактерий в их эволюции.

Для достижения этих целей автором сформулирован спектр задач по определению полиморфизма ряда генов ядерного и митохондриального генома выбранных объектов, построению маркерной системы ДНК-идентификации, оценке распространенности объектов исследования, включая симбиотических бактерий, выяснению роли симбионтов в изменчивости ДНК хозяев, установлению таксономического статуса некоторых видов.

#### Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа Е.В. Шайкевич выполнена по традиционному плану, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение собственных экспериментальных результатов и их обсуждение,



выводы и список цитированной литературы. Работа изложена на 223 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 30 рисунков. Список цитированной литературы включает 361 наименование отечественных и зарубежных научных публикаций.

Во введении автором описана проблематика исследования, обозначена ее актуальность, теоретическая и практическая значимость, отмечены вопросы, требующие своего разрешения, сформулированы цели и задачи, определены авторские критерии научной новизны и практической значимости работы, представлены положения, выносимые на защиту.

В первой главе приводится анализ литературных данных по характеристике исследованных объектов, их биологии, экологии, таксономии, генетике, методах идентификации. Речь идет о комарах комплекса *Culex pipiens* и *Culex torrentium*, божьих коровках рода *Adalia* и их симбиотических бактериях. Обзор литературы написан на высоком научном уровне, дает полную информацию по этим вопросам, свидетельствует о высокой теоретической подготовке, эрудиции и компетентности автора. Он содержит так много систематизированных ценных данных, что может стать основой двух интересных для многих читателей обзорных статей или монографии.

В качестве формального недостатка я бы отметил отсутствие заключительного абзаца, который связывает всю эту информацию с экспериментальными задачами работы.

Во второй главе «Материалы и методы» автор приводит сведения о природных популяциях комаров и божьих коровок, которые изучались в работе; описаны молекулярные методы работы с ДНК, в том числе, варианты методов ПЦР, получение и клонирование рекомбинантных ДНК, секвенирование ДНК; методы компьютерного и статистического анализа данных. Все они направлены на адекватное решение поставленных автором задач, и это в значительной степени обеспечивает высокий доказательный уровень полученных в работе результатов. В этом же разделе представлены и некоторые результаты, в виде номеров, зарегистрированных в GeneBank,



секвенированных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 и межгенного спейсера рДНК.

Результаты собственных исследований представлены в третьем разделе диссертации, который состоит из двух частей, посвященных представителям *Culex pipiens* и *Adalia*, соответственно. Автором проведены масштабные исследования и получен громадный объем новых данных, направленных не только на морфо- и биогеографическую характеристику изучаемых объектов, но прежде всего, на достижение основной цели – генетическую идентификацию и дифференциацию различных видов и форм этих таксономических групп.

К основным результатам, обеспечивающим научную новизну диссертации Е.В. Шайкевич, следует отнести определение степени генетических различий между изученными таксонами комаров и божьих коровок на основе предложенных маркеров; разработку метода идентификации видов и форм в роде *Culex*, в частности, видов *C. pipiens* и *C. torrentium*; выявление роли симбиотической бактерии *Wolbachia* (ее различных групп) в дивергенции и географическом распределении представителей комплекса *Culex pipiens*; обнаружение новых митохондриальных гаплотипов в популяциях божьих коровок и пересмотр таксономического статуса ряда изученных форм. Кроме того, заслуживают внимания данные по сцепленности определенных митохондриальных гаплотипов у этих форм с определенным симбионтом. Автор делает важные выводы о влиянии симбионтов на структуру генофондов, связанную с экспансией определенных митохондриальных гаплотипов, и о практическом отсутствии событий горизонтального переноса симбионтов.

В этой связи возникает вопрос, какие молекулярно-генетические, филогенетические или иммунологические факторы определяют хозяйскую специфичность симбионтов.

Обсуждение полученных данных представлено в четвертом разделе. Оно посвящено базовым вопросам, связанным с таксономическими различиями исследованных объектов, роли симбионтов, корреляции митохондриальных



генотипов и типа бактерий, географическим закономерностям в распространении мт-гаплотипов, вопросам гибридизации и интрогрессии мт-ДНК в зонах симпатрии. Собственно обсуждение дано скорее в форме заключительного подведения итогов с привлечением некоторых литературных данных.

В этой связи, в качестве замечания, следует отметить, что необходимо было значительно большее привлечение литературных данных именно для сопоставления с собственными результатами, чтобы подчеркнуть в одних случаях их новизну, а в других достоверность.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертационной работы.

Работа Е.В. Шайкевич выполнена на высоком научном и методическом уровне, с использованием современных методов популяционной и молекулярной генетики, полностью адекватных для решения поставленных задач. Этим определяется достоверность полученных автором результатов, которые подробно и логично описаны. Они опубликованы в 27 статьях, в том числе, 9 зарубежных и представлены в 16 тезисных сообщениях. Выводы работы обоснованы и соответствуют полученным результатам, целям и задачам исследования.

Автореферат дает четкое представление о полученных результатах и отражает содержание диссертации.

Научно-практическая значимость и рекомендации по использованию результатов.

Фундаментальная научная значимость полученных результатов связана с популяционно-генетической характеристикой и определением таксономического статуса изученных организмов и определением роли симбиотических бактерий в эволюции близких видов. Практическая значимость результатов связана с биологическими особенностями этих объектов. Поскольку кровососущие насекомые (комары) наделены различной способностью к переносу возбудителей трансмиссивных заболеваний человека



и животных, то точная диагностика, разработанная автором, позволяет оценить роль представителей близких видов в распространении заболеваний и разработать способы защиты. Разные виды божьих коровок могут найти использование для биологической защиты растений в качестве регуляторов численности вредителей растений. Разработанные или адаптированные методы анализа ДНК могут быть использованы в молекулярно-генетических работах данного профиля. Полученная научная информация может быть также использована при подготовке учебных курсов лекций по генетике для студентов биологических факультетов ВУЗ-ов. С материалами диссертации рекомендуется ознакомить Институт молекулярной генетики РАН, Институт биологии развития РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Институт биологии УНЦ РАН.

К работе нет существенных замечаний. Кроме уже отмеченных выше, остается неясным вопрос о том, почему в одном водоеме сосуществуют зараженные и незараженные личинки комаров одного вида. Неясно, о каких комплексах насекомых идет речь в обсуждении, с точки зрения необходимости их изучения методами разработанными в данном исследовании. В каком смысле говорится о биологической полезности явления бессамцовости у божьих коровок при их заражении бактериями. Какие противоречия о таксономии комаров *Culex pipiens*, которые, как говорится в Обзоре, существуют между российскими и зарубежными авторами, удалось разрешить в результате проведенных исследований?

#### Заключение.

Диссертационная работа Елены Владимировны Шайкевич «Генетическая идентификация близкородственных видов насекомых и роль симбионтов в их эволюции (на примере комплекса видов *Culex pipiens* и *Adalia spp*)» является законченным самостоятельно выполненным научно-исследовательским трудом, содержит новые научно-практические результаты в области генетики, совокупность которых можно охарактеризовать как новое крупное достижение в развитии биологической науки. Диссертация полностью соответствует

требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней ВАК Министерства образования и науки РФ (постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Е.В. Шайкевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент

Рысков Алексей Петрович

Доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН,

Заведующий лабораторией Федерального

государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена

Российской академии наук

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 34/5

Телефон: +7(499) 135-87-41, e-mail: [ryskov@mail.ru](mailto:ryskov@mail.ru)

Подпись А.П. Рыскова заверяю:

Ученый секретарь ИБГ РАН



/ Г.В. Мансурова/

16.02.2015