

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Ирины Игоревны Горячевой «Генетическое изучение популяций насекомых в связи с их инвазивностью и биологическими эффектами бактериальных симбионтов».

Представляемая работа Ирины Игоревны Горячевой посвящена кардинальным проблемам биологической эволюции – явлению смены ареалов и возможности широкого расселения видов, видам –двойникам и эволюции генетического аппарата, а также изучению популяционно-генетических аспектов в нескольких симбиотических системах. Успех исследования определяется постановкой актуальной задачи и выбором для нее адекватного объекта. Этому условию абсолютно соответствует представленная работа. В качестве объектов исследования выбрано три рода насекомых, достаточно хорошо изученных генетически и служащих модельными объектами для изучения эволюционно-генетических процессов. *Harmonia axyridis* интересна необычно быстрым всесветным расселением, произошедшем в очень короткие сроки. Генетическая идентификация видов-двойников исследовалась на комарах рода *Anopheles* комплексе «maculipennis». *Drosophila melanogaster* послужила для изучения генетических механизмов формирования и сохранения эндосимбиотической системы. Предпосылкой для широкой инвазивности *H. axyridis* послужил ряд биологических и экологических особенностей вида, но этого недостаточно для объяснения столь глобальной инвазии, которой почему-то не было ранее. Возникла она только в последние десятилетия. Появилась необходимость поиска специфических для *H. axyridis* биологических возможностей. К числу таких особенностей может быть отнесена зараженность вида цитоплазматическими симбионтами, расширяющими адаптивный потенциал вида-хозяина. В представленной работе сделан первый шаг к изучению возможного влияния репродуктивных симбионтов на способность к инвазии вида-хозяина, определены видовой состав, изменчивость и распространение в популяциях нативного и инвазивного ареала *H. axyridis* цитоплазматических симбионтов – бактерий *Spiroplasma*, *Rickettsia* и *Wolbachia*. Показано отсутствие снижения уровня изменчивости в популяциях колонистов, что облегчает приспособление вида к новым условиям среды. Инвазивные популяции не страдают от инбредной депрессии и имеют более высокую приспособляемость по сравнению с нативными. Отсутствие инбредной депрессии, наблюдаемое в представленном исследовании, свидетельствует об утере летальных мутаций в инвазивных популяциях, в следствии прохождения через не слишком узкое бутылочное горлышко.

Была проведена генетическая идентификация сибсовых видов малярийных комаров комплекса «*maculipennis*». Результатом этой части работы стало изменение систематики рода *Anopheles*, выделение нового вида и сведения двух других в один вид. У генетически типированных особей были обнаружены морфологические и цитогенетические отличия, существенные для идентификации видов. Эта часть работы имеет практический выход, так как разные виды по-разному относятся к малярийному плазмодию, переносчиками которого являются не все виды комплекса.

Симбиотические ассоциации бактерий и эукариотических организмов широко распространены в природе и являются мощным эволюционным фактором генетической реорганизации и адаптивных возможностей обоих партнеров. Ряд преимуществ, получаемых *Drosophila melanogaster* в результате заражения *Wolbachia* – увеличение продолжительности жизни, повышение устойчивости к энтомопатогенам, снижение избирательности при спаривании показано в работе впервые. Проведена экспериментальная проверка возможности рекомбинации двух штаммов *Wolbachia*. Показана внутригенная рекомбинация, которая подтверждена наличием рекомбинантных форм в системе с двойной инфекцией клеток. Для проведения этого исследования была получена клеточная культура *D. melanogaster*. Это первое экспериментальное подтверждение возможности рекомбинации, которая ранее была показана с использованием биоинформационных подходов.

Работа построена по общепринятому принципу. Состоит из введения, в котором дана общая характеристика работы. Обсуждена актуальность проблемы. Упомянуты методы с использованием которых решаются поставленные задачи. Перечислены основные положения, выносимые на защиту, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость представленной работы.

Далее идет обширный литературный обзор по всем трем направлениям, которые исследуются в представленной работе. Первая часть посвящена роду *Anopheles*, включающему 465 признанных видов, из которых 70 способны передавать малярийного плазмодия. За последнее время расширился список опасных инфекций переносимых видами этого рода и в связи с климатическими изменениями наблюдается инвазия и расширение ареалов в сторону более северных районов. Отсюда ясно насколько важна идентификация видов и хорошая система рода. Подробно рассмотрен комплекс видов надвида *An. maculipennis*. Перечислены виды двойники,

выделенные цитогенетическими и молекулярно-генетическими методами. Однако валидность некоторых видов вызывает сомнения, требует дополнительных исследований, которые и были проведены в настоящем исследовании. К сожалению, в обзоре не хватает некоторых теоретических рассуждений, связанных с проблемой вида и видообразования и подходов к систематике. На протяжении нескольких веков существования научной систематики ей были свойственны смены концепции вида узкой и широкой. Можно начать с Линеяна (широкий вид) и Жардана (практически любая форма). Во времена более близкие к нам широкая концепция вида, обоснованная Семеновым-Тяньшанским была наиболее принятой по крайней мере для позвоночных животных, высших растений и достаточно изученных насекомых и других беспозвоночных, но внедрение в систематику современных хромосомных и молекулярно-генетических методов, приводящих к выделению большого количества новых форм во многих случаях заставляет отказаться от широкой концепции вида в пользу узкой. Новые знания влияют и на саму концепцию вида. Эта старая, казалось бы, область науки, сейчас входит в новую фазу развития, характеризующуюся выделением большого количества новых видов, что из них окажется надежным видом покажет будущее и это будет зависеть прежде всего от принятой концепции вида, в основе которой всегда будет вид, как генетически замкнутая система.

У меня возникает вопрос насколько оправдано выделение, поддержанное в данной работе *An. artemievi*, основанное на небольших морфологических отличиях, но поддержанных очень малыми различиями всего в двух генах. И почему вид *An. daciae* оказался не валидным только из-за отсутствия различий в двух генах, а если исследовать какие-то другие гены? Тем более, что дальше говорится о делении *Harmonia axyridis* на восточную и западную группы популяций отличия которых подтверждается как морфологическими признаками, так и данными структуры фрагмента митохондриального гена *cox1* и данными микросателлитного анализа по 18 локусам. Но в данном случае *H. axyridis* никто не делит на 2 вида. Почему? Не связано ли это с использованием разной концепции вида в случае комаров и божьих коровок?

Исследования генетики *Harmonia axyridis*, начатые еще Ф.Г. Добжанским имеют столетнюю историю. Это благодатный объект для популяционных исследований, обладающий очень удобными морфологическими признаками – окраска элитр, наследуемая моногенно и контролируемая серией аллелей с известной доминантностью, морфология

элитрального гребня и рисунок пронотума. На основании распространения этих признаков был описан весь нативный ареал *Harmonia axiridis*. По этим же признакам было определено, что инвазивные особи происходят из восточной части ареала. Но инвазивные популяции отличались от нативных рядом преимуществ - укороченным временем поколения, эффективностью жизненного цикла, что собственно и способствовало столь успешному расселению. К тому же, несмотря на малую численность вселенцев, у них отсутствовала инбредная депрессия.

В данной работе делается акцент на изучение инвазивности вида и причинах большей адаптивности по сравнению с нативными формами. Подчеркивается, что неоднократные выпуски *H. axiridis*, производившиеся с целью контроля численности хозяйственно вредных насекомых ни разу не дали положительных результатов. Специальной проблемой данного исследования стало изучение взаимоотношения эндосимбиотических бактерий с божьими коровками нативного и инвазивного ареалов с целью выяснения их возможного влияния на повышенную адаптивность жуков инвазивного ареала.

Изучение взаимоотношения эндосимбионтов с насекомыми хозяевами достаточно новое направление. Первое, что было обнаружено – влияние на репродуктивные возможности насекомых. Молекулярно-генетическими методами показано очень широкое заражение энтомофауны симбиотическими бактериями, рассматривающимися в настоящее время как важный фактор эволюции геномов насекомых.

Большим достоинством работы является прекрасный литературный обзор, посвященный *Wolbachia*. О *Wolbachia* рассказано все. Дана ее систематика, включающая номенклатуру линий, филогения, насчитывающая много миллионов лет, геном разных супергрупп, морфологические особенности, сравнительный анализ взаимоотношений с разными хозяевами, межгенная и внутригенная рекомбинация. Биологические воздействия *Wolbachia* на насекомых, репродуктивный паразитизм, цитоплазматическая несовместимость, индуцирование партеногенеза, феминизация, андроцид. Подчеркивается малая изученность ряда явлений. Подробно обсуждаются биологические эффекты *W. pipientis* в симбиотических системах с насекомыми. Наследственная передача симбионта в гамето-, оогенезе и сперматогенезе хозяина. Показана особая роль клеточных культур в изучение взаимодействия *Wolbachia* с клетками хозяина. Обсуждаются перспективы практического применения *Wolbachia* в контроле численности некоторых

насекомых и их способности к переносу опасных инфекций человека. Эта часть обзора заслуживает быть опубликованной, учитывая его большой объем, лучше всего это сделать в виде отдельной брошюры.

В главе материалы и методы перечислен большой материал, положенный в основу работы. Использовано 18 линий *Drosophila virilis*, тестированные на наличие *Wolbachia*, линия *D. simulans* дикого типа, несколько линий *D. melanogaster* одна из которых была специально создана для изучения предпочтения самок и конкурентоспособности самцов. Была получена культура клеток *D. melanogaster* из линии дикого типа и лабораторной. Используются божьи коровки из 8 локалитетов нативного ареала и из такого же количества локалитетов инвазивного ареала, а также линии лабораторного разведения биоконтрольные. Приведена карта сбора материала и дана таблица нативных, инвазивных и биоконтрольных популяций с указанием происхождения и количества особей. Комары комплекса *Anopheles maculipennis* первичная видовая принадлежность которых определена по морфологическим признакам, собирались в течении 10 лет в южных районах СНГ. Материал с указанием точек отлова представлен в виде таблиц в приложении.

Работа выполнена с использованием широкого набора современных методов генетического, морфологического, цитогенетического, молекулярно-генетического анализа и статистической и биоинформационной обработки. Каждый метод подробно описывается с указанием что сделано и как в данной работе, т.е. частично сюда вошли и результаты.

Результаты по всем трем направлениям приведены отдельно и каждый раздел включает обсуждения. Раздел по роду *Anopheles* включает дендрограммы визуализирующие филогенетические взаимоотношения представителей рода по результатам анализа фрагмента митохондриального гена *cox1*, а также медианные сети митохондриальных гаплотипов *An.maculipennis*. Анализ структуры ITS2 комплекса *messeae* снабжен электрофореграммой рестрикции продуктов амплификации

В разделе результатов изучения инвазии *Haemaphysalis axyridis* представлены результаты влияния симбиотических бактерий на увеличение адаптивности *H.axyridis* и приводится сравнение нативных и инвазивных популяций. Рассмотрено влияние трех эндосимбионтов *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, отмечается, что последняя не была найдена в инвазивных популяциях. По-видимому, влияние этого симбионта на биологические свойства хозяина скорее отрицательные.

В третьем разделе показаны результаты биологических эффектов, особенностей передачи, механизмов поддержания и наследования *Wolbachia* у *Drosophila melanogaster*. На этом примере показано сколь мощными эволюционными факторами как для хозяина, так и для эндосимбионта являются эти взаимоотношения. В конце работы в виде выводов (9 пунктов) резюмируется сделанное в диссертации.

Список цитируемых работ состоит из 512 названий, из которых только 52 на русском языке.

Научная новизна работы определяется рядом приоритетных результатов. Автором описан новый вид в комплексе «maculipennis» - *An. artemievi* и изучено его распространение. Исследовано распространение *An. persiensis*, *An. martinus*, определена южная граница *An. messeae*.

Показано единое происхождение инвазивных популяций *H. axyridis* Старого и Нового света. Впервые выявлено повышение компонентов приспособленности *H. axyridis* в популяциях инвазивного ареала. выявлены различия по времени поколения, являющиеся существенной причиной успешной инвазии. Впервые показана множественная инфицированность *H. axyridis* репродуктивными симбиотическими бактериями. *Wolbachia* из супергрупп А, Е и N у *H. axyridis*. На основании экспериментальных данных, высказано предположение о возможных отрицательных ассоциативных связях между *Spiroplasma* и формированием способности к инвазии у *H. axyridis*.

Впервые показано, что продолжительность жизни, скорость реализации процессов старения и гибели различаются у самок *D. melanogaster* с различным инфекционным статусом. Получены данные о повышенной устойчивости инфицированных *Wolbachia* *D. melanogaster* к энтомопатогенным грибам в стрессовых условиях среды и показано влияние инфекции *Wolbachia* на избирательность репродуктивного поведения дрозофилы. Наиболее значимым фундаментальным достижением работы является экспериментально показанная возможность рекомбинации штаммов *Wolbachia* в клетках клеточной культуры при коинфекции.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Выводы основаны на большом объеме полученных автором приоритетных экспериментальных данных, полученных с использованием широкого методического арсенала, которым автор прекрасно владеет.

Исследование имеет значительную научно-практическую ценность т.к. в работе получены новые данные по переносчикам особо опасных инфекций и исследованы вопросы, связанные с инвазиями и изменениями ареалов видов.

Работа не лишена некоторых незначительных технических недостатков. Например, при цитировании литературы по тексту в скобках принято давать цитирование в соответствии с временем появления работы. В какой-то степени это имеет значение, поскольку указывает на приоритет цитируемой работы. Это правило в некоторых случаях оказалось нарушено. Во-вторых, первое упоминание вида нужно давать с полным родовым названием, в последующих упоминаниях достаточна только одна буква. Встречаются нарушения этого правила. Указанные технические погрешности ни в коем случае не снижают в целом очень высокую оценку работы.

Диссертация И.И. Горячевой «Генетическое изучение популяций насекомых в связи с их инвазивностью и биологическими эффектами бактериальных симбионтов» является законченной научно-квалификационной работой, полностью отвечающей критериям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор Ирина Игоревна Горячева заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Елена Алексеевна Ляпунова
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН)
119334 Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: elyapunova@yandex.ru
Тел.: +7 (499) 135 - 7583

 Е.А. Ляпунова

Подпись д.б.н. Е.А. Ляпуновой заверяю
Ученый секретарь ИБР РАН
07.03.2017

 М.Ю. Хабарова
