

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Ирины Игоревны Горячевой «ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ НАСЕКОМЫХ В СВЯЗИ С ИХ ИНВАЗИВНОСТЬЮ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ ЭФФЕКТАМИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика

Роль симбиоза как ключевого фактора в возникновении и ранней эволюции эукариот осознана только недавно. Если на симбиоз посмотреть как на одно из проявлений пластичности генома, позволяющего приобретать (соединять) целые биосинтетические пути, то станет ясно, что каждый раз мы сталкиваемся не с частным случаем «взаимопомощи» в природе, а наблюдаем общий механизм приобретения организмом новых (для данного организма), но предсуществовавших в природе метаболических путей. Далее должен следовать длительный и разнонаправленный в каждом конкретном случае процесс эволюционной адаптации партнеров. Он включает, прежде всего, взаимное регулирование генетических систем симбионтов и хозяев. Начальные этапы строятся на разнообразных преадаптациях, позволяющих избегать защитные механизмы хозяина, и формировать механизмы обмена субстратами, генными продуктами, генами. В общих словах можно сказать, что это происходит в результате коэволюции партнеров, однако что конкретно стоит за этим понятием, какие этапы проходит вид, как реализуется этот процесс на множестве различающихся, обитающих в различных условиях своего ареала индивидов, формирующих то, что мы небрежно называем видом - все это исследовано очень мало.

Диссертационная работа Ирины Игоревны Горячевой посвящена изучению и анализу генетических аспектов популяционных взаимоотношений в нескольких симбиотических системах, включающих насекомых и их бактериальных эндобионтов. Актуальность темы не вызывает сомнений: обширный пласт современных исследований внутриклеточного симбиоза как важнейшего феномена, позволяющего хозяину приобретать новые биологические характеристики, биосинтетические потенции и т.д., почти не затрагивает популяционно-генетические аспекты явления. В значительной степени это определяется трудностями при поиске адекватных подходов, поэтому так важен поиск хороших модельных систем. Представленная диссертация вносит существенный вклад в разработку этой важной темы.

К наиболее существенным достижениям диссертанта можно отнести следующие:

1. Разработка молекулярных методов идентификации видов-двойников в роде *Anopheles*. Выявление молекулярных штрихкодов (barcoding), что позволило разобраться в сложной и неоднозначно трактуемой системе этого рода, описать новый вид комаров – *A. artemievi*, выявить значительный внутривидовой полиморфизм *A. messeae*. и рассматривать *A. daciae* как один из полиморфных вариантов, не подтвердивших пока статус криптического вида.

2. Сравнительное исследование генетической структуры нативных и инвазивных популяций божьих коровок – *Harmonia axyridis*. В диссертации убедительно показано разделение нативных популяций на восточную и западную группы, а также, что источником инвазии являются популяции восточной группы. Показано, что в стабильных инвазивных популяциях восстанавливается генетическая изменчивость практически на уровне нативных популяций, что служит фактором, обеспечивающим жизнеспособность и успешное укоренение таких популяций.

3. Обнаружение у – *H. axyridis* трех различных репродуктивных симбионтов: *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*. Молекулярная филогения симбионтов показывает, что они приобретались хозяевами многократно. *Spiroplasma*, по-видимому, более функционально значимый симбионт. Показано ее полное отсутствие в инвазивных популяциях, что позволяет предполагать отрицательную связь этого симбионта с инвазивностью популяций *H. axyridis*.

4. Детальное исследование взаимоотношений партнеров в системе *Drosophila melanogaster* / *Wolbachia pipientis* на популяционно-генетическом уровне. Это позволило показать, что отношения симбионта и хозяина носят мутуалистический характер: наследуемая по материнской линии *Wolbachia* повышает приспособленность зараженного хозяина. Бактерия оказывает влияние на поведение хозяина в скрещиваниях. Сложная система выбора партнера зависит от генотипа и инфекционного статуса линий *D. melanogaster*. Специфическое репродуктивное поведение *D. melanogaster*, наряду с альтернативным наследованием вольбахий

через гаметы отца, является элементом компенсаторной системы сохранения *Wolbachia* у дрозофилы.

5. В условиях клеточной культуры впервые показана генетическая рекомбинация между линиями *Wolbachia*. Использование множественно маркированных линий симбионтов позволяет считать гомологичную рекомбинацию наиболее вероятным молекулярным механизмом.

Материалы диссертации были представлены на многочисленных конференциях и семинарах, в том числе – международных. Они опубликованы в 30 статьях, в том числе в таких престижных отечественных и зарубежных изданиях как Генетика, Proc. R.Soc. Lond.; Animal Behaviour; J.Med.Entomol. и др.

Полученные данные являются фундаментальной базой для важных практических разработок, поскольку относятся к практически значимым объектам – переносчикам опасных заболеваний (*Anopheles*) или сельскохозяйственно важным энтомофагам (*Harmonia*). Свидетельством тому публикации в хороших прикладных журналах, таких как Медицинская паразитология и паразитарные болезни.

Диссертация имеет традиционную структуру: Введение, Обзор литературы, Материал и методы, Результаты (включает три подраздела, каждый из которых завершается обсуждением), Заключение. Работа изложена на 320 страницах машинописного текста, имеет приложения (5 страниц); список цитированной литературы содержит 512 публикаций. Работа содержит необходимые иллюстрации, она включает 27 рисунков и 22 таблицы

В главе «Обзор Литературы» автором последовательно рассмотрены работы, дающие представление о современном состоянии исследований по трем рассматриваемым системам: комарам рода *Anopheles*, божьим коровкам *Harmonia* и их симбионтам и *Wolbachia*- симбионтам различных членистоногих. Обзор, особенно его последняя часть, посвященная *Wolbachia*, представляет большой самостоятельный интерес. Автором собраны, проанализированы и хорошо структурированы многочисленные и разнородные сведения, касающиеся этих симбионтов, их влияния на популяционно-генетическую структуру хозяев. Эта часть исследования заслуживает опубликования как цельная, самостоятельная работа.

Глава «Материал и методы» составлена достаточно подробно. Можно особо отметить не просто разнообразие использованных методов, а гармоничное

сочетание осмысленного выбора мест сбора, хороших морфологических, описательных методов с молекулярным анализом, подкрепленным хорошей статистической обработкой.

К этой главе есть несколько незначительных замечаний. При описании методов, использованных для построения филогении симбионтов, следовало бы, как мне кажется, назвать гены (фрагменты генов), которые были использованы для анализа. Эти сведения приводятся в результатах, однако повторить их в методической части было бы полезно.

В некоторых случаях пропущены регистрационные номера депонированных в GenBank последовательностей (стр 174).

Глава «Результаты» содержит три подглавы, каждая из которых завершается обсуждением, так что общее обсуждение отсутствует.

Первая часть посвящена многокомпонентной симбиотической системе – комарам *Anopheles*, естественным переносчикам малярийного плазмодия (возбудителя малярии), которые могут быть искусственно инфицированы симбиотическими бактериями, что можно использовать для контроля численности и/или инфицированности плазмодием комаров и, таким образом, бороться биологическими методами с этим опасным и широко распространенным заболеванием.

Основные достижения этого раздела касаются разработки молекулярных методов идентификации видов-двойников в роде *Anopheles*. Разработка методов штрихкодирования (barcoding) в последние годы выросла в важное направление на границе молекулярной биологии и классической зоологии и ботаники. Важно и прикладное значение таких исследований, т.к. виды-двойники, неразличимые на взгляд исследователя, часто хорошо различимы для их внутриклеточных симбионтов/патогенов. Так что возможность штрихкодирования сестринских видов позволяет правильно описать их распространение, изучать структуру популяций и т.д., т.е. является необходимым этапом для понимания реальной генетико-географической структуры комплекса видов. Автору удалось показать высокий полиморфизм по ITS2 последовательности и связать определенные варианты с географическим расселением комаров. Полученные данные представляются важными и интересными, однако хотелось бы обратить внимание, что те или иные маркеры – еще не формируют виды, а лишь позволяют их узнавать.

Вторая часть работы посвящена изучению популяций *Harmonia axyridis* в нативной и инвазивной частях ареала. Для мониторинга генетической структуры популяций использованы молекулярные маркеры – ген митохондриальной цитохромоксидазы и микросателлиты. Дана оценка генетического груза в популяциях. Результаты этих исследований позволили прийти к нескольким очень важным выводам. Во-первых, оказалось, что ареал божьх коровок естественно разделяется на Восточный и Западный кластеры. Можно определить происхождение инвазивных популяций: удалось показать, что инвазивные популяции и Нового и Старого Света происходят от популяций Восточного кластера. Неожиданно оказалось, что уровень генетической изменчивости, выявленный по обоим использованным маркерам, достаточно близок в нативных и инвазивных популяциях. На первый взгляд полученный вывод противоречит общим представлениям о сокращении изменчивости при прохождении «бутылочного горлышка». В этом я усматриваю значительную ценность результата: хорошо документированный парадокс служит важнейшим толчком в исследовании. Высказанное автором предположение, что успешными (стабильными) инвазивными популяциями оказываются те, которые смогли восстановить популяционный полиморфизм практически до уровня нативных популяций. За счет чего может происходить такое восстановление – вопрос будущих исследований. На этом фоне рассмотрено распределение в популяциях внутриклеточных симбионтов. Для *Rickettsia* показана примерно одинаковая представленность этих симбионтов в нативных и инвазивных популяциях. Полученные данные можно трактовать как отсутствие влияния симбионта на инвазивность (способность формировать стабильные инвазивные популяции) хозяина, хотя отсутствие различий в уровне инфицированности нативных и инвазивных популяций не обязательно говорит об отсутствии влияния симбионтов на образование инвазивных популяций. Разве инфицирование невозможно после формирования таких популяций? С другой стороны, отсутствие *Spiroplasma* во всех инвазивных популяциях, не может ли быть следствием «эффекта основателя» если инвазивные популяции образуются за счет небольшого числа особей, которые потом быстро размножаются. Высказанные сомнения, безусловно, являются дискуссионными и оставляют автору право иной трактовки.

Третья часть результатов посвящена изучению популяционно-генетических аспектов в системе *Drosophila melanogaster/Wolbachia*. Надо заметить, что симбиоз членистоногих с *Wolbachia* считается сравнительно молодым, о чем говорит низкая специфичность инфекции. В отличие от

«древних» симбиозов, как, например, симбиоза тлей и бактерий *Buchnera*, когда роли партнеров определились и можно говорить об определенных функциях симбионта в метаболизме хозяина, ситуацию с *Wolbachia* можно рассматривать как промежуточный этап. В такой ситуации корректное выявление влияния симбионтов – очень сложная многокомпонентная задача. Особенно сложно оценивать популяционные эффекты воздействия симбионтов. Эта задача успешно решается автором в различных экспериментах, позволяющих оценить конкретные особенности исследуемых симбиотических систем: механизмы поддержания симбионтов в популяциях хозяина, особенности полового поведения мух *Drosophila melanogaster* с различным инфекционным статусом. Показана возможность двуродительского наследования *Wolbachia*. Однако еще более интересны использованные подходы, позволяющие оценить влияние симбионтов на интегральные характеристики, такие как приспособленность. Работа на хорошо подготовленном объекте – дрозофиле – позволяет проводить эксперименты на изогенных линиях, маркировать партнеров в спаривании, использовать межвидовые скрещивания и т.п. Убедительно показано, что бактерионосительство расширяет адаптационный потенциал популяции, влияя, таким образом, на экологические возможности вида. Хотелось бы специально отметить получение перевиваемой культуры клеток дрозофилы, инфицированной вольбахиями как модельной системы для изучения различных сторон и проявлений симбионтов. Это очень важное методическое достижение, ориентированное на будущее, открывающее новые перспективы.

Завершается работа «Заключением». Эта небольшая по объему глава (6 страниц) подводит общий итог. Она в известной мере выполняет функцию резюме и служит общим обсуждением. Наконец, автор дает краткое изложение перспектив исследования.

Работа И.И.Горячевой написана прекрасным русским языком. Она легко и с интересом читается

В трех частях диссертационной работы собран и обобщен уникальный материал, вносящий существенный вклад в наши представления о генетико-популяционных аспектах симбиотических систем.

Рассматриваемая диссертационная работа является законченным, в рамках поставленных задач, исследованием. Тема и результаты диссертационной работы соответствуют специальности 03.02.07 – генетика. Основные результаты достаточно полно отражены в 30 статьях,

