

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

БЕГА АННЫ ГЕННАДЬЕВНЫ на тему:

«РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОМАРОВ ПОДРОДА *STEGOMYIA* В

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.7 – генетика и 1.5.15 – экология (биологические науки)

Диссертационное исследование Бега А.Г. посвящено важной, как с теоретической, так и с практической точек зрения, проблеме выявления характера распространения, экологических особенностей и генетической изменчивости видов комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*, обитающих на территории России. Необходимость понимания экологических ниш, определяющих границы современного распространения инвазионных видов кровососущих комаров, переносчиков вирусных заболеваний человека и животных, и существующие сложности в точности идентификации данных видов, определяют актуальность комплексного эколого-генетического исследования. Объект исследования – шесть видов комаров подрода *Stegomyia*, включающего три чужеродных и три нативных вида, обитающих на территории России. У чужеродных видов *Ae. aegypti* (желтолихорадочный комар), *Ae. albopictus* (азиатский тигровый комар) и *Ae. cretinus* (средиземноморский тигровый комар) нативные ареалы расположены вне территории России, а именно, в тропической Африке, Юго-Восточной Азии и на Кипре соответственно. У аборигенных видов *Ae. galloisi*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* нативные ареалы частично расположены на территории некоторых областей России – от Западной Сибири на западе до Тихого океана на востоке.

А.Г. Бега выполнила, подготовила и представила оригинальное, интересное и объемное исследование, имеющее высокое фундаментальное и прикладное значение. По крайней мере, пять важных позиций, обосновывающих научную значимость работы, обращают на себя внимание при ознакомлении с работой: 1. Исследование базируется на многолетней методически выверенной полевой

работе, включавшей в т. ч. сбор и анализ 8938 особей (*Ae. albopictus* – 7094, *Ae. flavopictus* – 1526, *Ae. galloisi* – 1, *Ae. sibiricus* – 299; *Ae. cretinus* – 12; *Ae. aegypti* – 5) из 84 локалитетов, расположенных в Абхазии (8 локалитетов), Краснодарском крае (42 локалитетов), Крыму (4), Новосибирской (2); Томской (1), Амурской (2) областях, Еврейской автономной области (1), Приморском (15), Красноярском (1) и Хабаровском краях (8).

2. Нельзя не отметить изящный синтез более простых и относительно сложных методов анализа морфологических признаков и баркодирования ДНК для оценки их потенциальных возможностей для дифференциации изученных видов. В частности, на основе анализа отловленных особей самцов, предложены видоспецифичные морфологические признаки для дифференциации четырех видов комаров *Ae. albopictus*, *Ae. galloisi*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus*, ранее никем из российских специалистов не использовавшихся. Кроме этого, впервые показано, что баркодирование ДНК является хорошим методом дифференциации четырёх видов комаров *Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus*, однако гаплотипы двух других видов *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi* не дифференцируются с помощью вышеуказанного метода.

3. Методом ДНК-баркодинга дана оценка разнообразия митохондриальных гаплотипов *Ae. sibiricus*, *Ae. galloisi*, *Ae. flavopictus*, *Ae. albopictus* комаров, обитающих на юге европейской части России, в Западной части Сибири и на Дальнем Востоке России. Выявлены 19 новых гаплотипов и впервые получены данные митохондриального генома *Ae. sibiricus*, *Ae. flavopictus* и клеточной культуры *Ae. albopictus*.

4. Уточнены границы ареала трех видов комаров (*Ae. albopictus*, *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus*) и созданы векторные карты их географического распространения. На основе данных точек находок *Ae. albopictus* в 2017-2021 гг. было уставлено расширение ареала инвазионного вида азиатского тигрового комара, включенного в список ТОП -100 самых опасных инвазионных видов России (ТОП-100) / Ред. Дгебуадзе Ю.Ю., Петросян В.Г., Хляп Л.А. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2018. 688 с., <https://top100worst.sev-in.ru/monograph.html>).

5. Для азиатского тигрового комара – получены новые данные, включающие: экологические факторы, лимитирующие инвазию *Ae. albopictus* на юге Русской

равнины, дана оценка скорости преимагинального развития, выявлены особенности пищевого поведения на личиночных стадиях развития и представлены экологические предпочтения самок этого вида при выборе мест для откладки яиц.

Проведенные исследования и полученные результаты по этому виду станут не только серьезным вкладом в развитие направления «Биологических инвазий опасных чужеродных видов на территории России», но и в целом, послужат основой для планирования, проведения противоэпидемиологических мероприятий и развития специальных государственных мер по предотвращению и контролю инвазий.

Диссертация состоит из Оглавления, Введения, четырех Глав, Заключения, Выводов, Списка сокращений и условных обозначений. Диссертация изложена на 155 страницах, содержит 21 рисунок и 16 таблиц. Объем материалов не превышает средний объем диссертаций на соискание степени кандидата наук.

Диссертация начинается с Введения, в котором: обосновывается актуальность данного исследования, приводится краткое описание научной разработанности, обосновывается ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость, в краткой форме приводятся методы исследования, формулируются основные положения, выносимые на защиту, приводится оценка вклада автора и дается описание апробации работы. Также в этом разделе работы автор формулирует цель и задачи исследования. Основная цель работы состояла в изучении распространения, экологии и генетической изменчивости комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*, обитающих на территории Российской Федерации.

В **главе 1** (стр. 10-34) приводится общая количественная характеристика видового состава комаров подрода *Stegomyia* рода *Aedes* в мире, и список видов из этого подрода, обитающих на территории России (раздел 1.1). В этом разделе в краткой форме (стр. 10-12) представлены: общие морфологические характеристики (размеров, окрасок самцов и самок); продолжительность жизни комаров в разных условиях обитания, характеристики условий размножения (условий откладки яиц, стадии развития личинок, длительности развития личинок

в зависимости от условий, стадии развития куколок), дневное и ночное поведение комаров, список вирусов, передаваемых комарами и др. Далее, в последующих шести подразделах (1.2.1-1.2.6), даются характеристики шести видов комаров (стр.12-32). Эта глава завершается обзором литературы по митохондриальному геному исследуемых насекомых, здесь представлен список опубликованных митохондриальных геномов в базе данных GenBank для изучаемых комаров. В завершающей части этого раздела отмечается, что для некоторых видов (точнее двух видов *Ae. sibiricus* и *Ae. cretinus*) митохондриальные геномы на момент написания данной работы в базе данных GenBank отсутствовали.

Глава 2 “Материалы и методы” (стр. 35-52) содержит подробное описание полевых методов сбора биологического материала и оценку плотности популяций (раздел 2.1), методов морфологического анализа комаров (раздел 2.2) и анализа природных популяций инвазионного вида *Ae. albopictus*, включая оценку суточной активности самок комаров и определение характеристик личиночных биотопов (раздел 2.3). В разделе 2.4 изложены методы проведения экспериментальных работ, направленных на изучение экологических и биологических особенностей инвазионного вида *Ae. albopictus*. В этом разделе представлены методы оценки важнейших характеристик вида при выборе мест для откладки яиц, скорости развития комаров на преимагинальных стадиях и пищевого поведения. Молекулярно-генетические методы исследования, включая выделение ДНК и проведение ПЦР, элюцию продуктов амплификации и секвенирование последовательностей ПЦР-фрагментов представлены в разделе 2.5. Эта глава завершается описанием методов биоинформационного (раздел 2.6) и статистического (2.7) анализов экспериментальных данных с описанием геоинформационной системы «Панорама 14.0.1» (раздел 2.8), которая была использована для построения карт расположения локалитетов отловленных комаров.

Здесь я хотел бы особенно отметить обоснованность большого внимания методам анализа экологических и биологических особенностей одного вида *Ae. albopictus*, как наиболее опасного инвазионного вида. Этот вид, как было

отмечено выше, включен в список ТОП-100 самых опасных инвазионных видов России и требует разработки эффективных методов для ограничения дальнейшего расселения. Без сомнений, пристальное внимание к этому виду будет способствовать разработке более эффективных методов борьбы с этим видом не только на территории России, но и в мировом масштабе.

В главе 3 (стр. 53 - 101) представлены полученные результаты. По объёму эта глава занимает примерно 41 % диссертации без учета литературы и состоит из четырех разделов, включающих семь подразделов. В разделе 3.1 (стр. 53-69), на основе собранных данных в 2017-2021 гг. (Таблица 4) присутствия видов, даны схематические карты распространения трех видов (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus*) на юге европейской части России. Показано, что два вида *Ae. cretinus* и *Ae. aegypti* зарегистрированы в двух и одном локалитетах соответственно. Судя по наличию личинок и имаго в этих локалитетах (г. Адлер, г. Сочи соответственно) можно утверждать, что эти два вида натурализовались на территории указанных городов, хотя пока они имеют локальное распространение. Другая картина складывается для азиатского тигрового комара (*Ae. albopictus*). Многолетние данные регистрации *Ae. albopictus* наглядно показывают, что наблюдается расширение распространения с 2017 по 2021 гг. Сопоставление автором данных регистрации вида с климатическими картами изолиний и картами типов растительности позволили утверждать что: 1) основными лимитирующими климатическими факторами, ограничивающими распространение *Ae. albopictus*, являются влажность воздуха и сумма эффективных температур летом; 2) этапы расширения распространения *Ae. albopictus* в значительной степени совпадают с границами отдельных флористических районов.

Характер распространения трех видов *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi*, *Ae. sibiricus* на Дальнем Востоке России, и в Восточной и Западной Сибири представлен в подразделе 3.1.2. Результаты полевых учетов показывают, что если в Восточной и Западной Сибири был обнаружен один вид – *Ae. sibiricus*, то на Дальнем Востоке обнаружены все три вида (Рисунок 10). Причем характер распространения этих видов *Ae. sibiricus*, *Ae. flavopictus*, *Ae. galloisi* существенно различается. *Ae.*

sibiricus зарегистрирован в шести, *Ae. flavopictus* – 18, *Ae. galloisi* – одном локалитетах. Однако, ограниченное количество находок (два самца в одном локалитете) *Ae. galloisi* не позволяет охарактеризовать степень распространения этого вида в Приморском крае. Для видов *Ae. sibiricus* и *Ae. flavopictus* представлены все характерные биотопы их обитания и районы их сплошного распространения.

Раздел 3.2 (60-81 стр.) полностью содержит результаты, полученные для природных популяций азиатского тигрового комара (*Ae. albopictus*), включая суточную активность нападения самок и характеристики личиночных биотопов. Показано, что суточная активность характеризуется бимодальной кривой, у которой первый пик охватывает утренние часы, а второй – вечерние часы перед закатом. Сравнительный анализ абиотических факторов личиночных биотопов позволил утверждать, что содержание в воде растворённого кислорода и водородный показатель воды могут служить лимитирующими факторами для развития личинок *Ae. albopictus*. Также, в другом разделе (3.3 стр. 82-92), результаты экспериментальных исследований показали, что самки *Ae. albopictus* предпочитают откладывать яйца в резервуарах объёмом от 1 до 10 литров, кислотности рН больше 4 единиц и солёности от 20 до 30 промилле. Экспериментальные оценки преимагинального развития *Ae. albopictus* показали, что первые три возраста личинки проходят около 5 суток, четвёртый возраст - от 12 до 16 суток. При наличии конкурентов четвёртый возраст проходят за 17-23 суток. Результаты анализа пищевого поведения личинок *Ae. albopictus* четвертого возраста показали, что они активнее поедают личинок первого возраста другого вида (*Cx. pipiens*), нежели представителей своего вида.

Результаты молекулярно-генетических исследований комаров подрода *Stegomyia* представлены в разделе 3.4 (93-101 стр.). В этом разделе последовательно представлены карты локалитетов сбора комаров и результаты анализа кластеризации митохондриальных гаплотипов *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. flavopictus*, *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi*. Построенная кладограмма BOLD фрагментов митохондриального гена *COI* наглядно показывает наличие пяти

однородных кластеров. Четыре однородных кластера являются видовыми, а один кластер - смешанным, и включает образцы двух видов *Ae. galloisi* и *Ae. sibiricus*. Этот анализ также позволил оценить гаплотипическое разнообразие видов. Наибольшее количество гаплотипов (10) было выявлено для *Ae. flavopictus*, для *Ae. sibiricus* выявлено 8 гаплотипов, 5 гаплотипов было выявлено для *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*, 1 гаплотип для *Ae. galloisi*. Для проверки результата, полученного с использованием BOLD фрагментов митохондриального гена *COI*, была построена кладограмма на основе полных митохондриальных геномов комаров подрода *Stegomyia*.

Интерес также представляет **глава 4** (стр. 102–115), посвященная обобщению и обсуждению результатов, представленных в предыдущих главах, и дающая суждение об их значении. В целом, содержание Главы 4 в наибольшей степени насыщено оригинальными сведениями об экологии комаров подрода *Stegomyia*, полученными соискателем в ходе данного исследования. Наконец, в **главе 4** обосновываются положения, сформулированные в итоговой части диссертации. Не вызывает сомнений, что диссертант является хорошим полевым экологом-натуралистом, для которого первостепенное значение имеет именно объект исследования.

Завершается диссертация коротким (стр. 117-118) разделом “Выводы”. В нем приведены шесть сформулированных выводов, целиком и полностью отражающих содержание результатов, изложенных в тексте диссертационной работы. На мой взгляд, очень важен вывод о том, что ДНК-баркодинг является достоверным методом определения четырёх видов комаров подрода *Stegomyia*: *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. flavopictus*, *Ae. cretinus*. Гаплотипы *Ae. sibiricus* кластеризуются вместе с *Ae. galloisi*, что не позволяет дифференцировать эти виды по изменчивости BOLD фрагмента митохондриального гена *COI*. На основании этих результатов обосновано формулируется гипотеза 3-го защищаемого положения.

Список использованной литературы включает 322 источника, из которых 273 иностранных. На страницах диссертации, как следует из описательной ее части,

представлено 16 таблиц и 20 рисунков (нумерация этих элементов в работе сквозная).

Несмотря на общую проработанность исследования и логичность умозаключений соискателя, имеется ряд замечаний разного характера к данной работе.

1. Имеется неудачное название рисунка 8. Рекомендуется другое название этой карты - Локалитеты трех изученных видов (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus*) на климатической карте изолиний температур и осадков юга европейской части России. Авторское название рисунка “Климатическая карта юга европейской части России” не отражает основное содержание и назначение этой карты.

2. Утверждение о том, что “Современная северная и восточная границы ареала *Ae. albopictus* соответствуют изогисте 550 мм в год и влажности воздуха 60% в летний период” требует уточнения (стр. 63). Поскольку эти значения более точно можно было бы определить с использованием климатической базы данных BIOCLIM с использованием географических координат локалитетов вида. Эта база данных широко используется в мире для построения моделей пространственного распространения видов (SDM).

3. Для наглядности хорошо было бы построить гистограмму приуроченности вида *Ae. albopictus* к типам растительности (стр. 64). Здесь также наблюдается не очень удачное название карты, представленной в рис. 9.

4. Для рисунка 10 (стр. 66) имеется такое же замечание, как для рисунка 8.

5. Для более строгого утверждения, можно было бы получить зоны толерантности вида к важнейшим проксимальным климатическим переменным среды (температуре воздуха в зимние и летние месяцы, общему количеству осадков) с использованием базы данных BIOCLIM (рис. 10) (стр. 66-67).

6. Для рисунка 11 (стр. 68) имеется такое же замечание, как для рисунка 9.

7. Для наглядности, результаты (стр. 76) по переменным среды (TDS, ES, Gh, Kh, pH, O₂, и NO₃) для *Ae. albopictus* можно было бы представить в виде “Столбиковой диаграммы с усами”.

8. Переменные среды для видов *Culex sp* с доверительными интервалами также лучше было бы представить в виде “Столбиковой диаграммы с усами” (стр. 80).

9. Результаты сравнительного анализа трех видов (стр. 82) *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens*, *An. plumbeus* в терминах коэффициентов вариации содержания в воде растворённого кислорода и водородного показателя требуют дополнительной проверки с помощью метода, описанного в работе (Feltz and Miller 1996, G.E. An asymptotic test for the equality of coefficients of variation from k population. Stat. Med. 1996, 15, 647–658).

11. Не очень удачное решение относительно регистрации митохондриального генома *Ae. sibiricus* как *Ae. galloisi* (стр.100).

12. В работе присутствуют незначительные опечатки.

В целом можно заключить, что замечания и вопросы, возникшие у меня в процессе чтения диссертации, не портят общего хорошего впечатления от самого исследования и его результатов. Из текста диссертации видно, что вся работа выполнена соискателем самостоятельно. Таким образом, соискатель проявил себя как вполне сложившийся исследователь, способный формулировать задачи исследования, организовать и обеспечить сбор полноценного полевого материала, освоить современные методы анализа молекулярно-генетических данных, наконец, предложить свой подход решения поставленных задач и продемонстрировать его преимущества.

Диссертационную работу А.Г. Бега можно охарактеризовать как законченное квалификационное исследование. Не вызывает сомнений его научная и практическая актуальность, а также новизна. Достоверность результатов, доказательная база исследования основываются на большом объеме оригинальных данных и тщательно продуманной схеме их формального анализа, с использованием методов адекватных как самому материалу, так и задачам исследования. В результате были получены хорошо аргументированные и вызывающие доверие выводы.

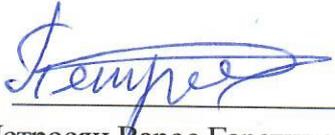
Автореферат отражает содержание диссертации и полностью отвечает

требованиям ВАК.

Содержание диссертации отражено в 14 публикациях, из которых 4 опубликованы в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ. Апробация результатов работы проведена на 10 международных и всероссийских конференциях и отражена в соответствующих тезисах и материалах.

Таким образом, диссертационная работа Бега Анны Геннадьевны «Распространение, экология и генетическая изменчивость комаров подрода *Stegomyia* в Российской Федерации», отвечает всем требованиям пп. 9-11, 13-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Бега А.Г., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.7 – генетика и 1.5.15 – экология (биологические науки).

Официальный оппонент,
доктор биологических наук (03.00.16 – экология),
главный научный сотрудник, заведующий
кабинетом биоинформатики и моделирования
биологических процессов, ФГБУН Институт проблем
эволюции и экологии им. А. Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН),
119071, г. Москва, Ленинский проспект д. 33
Телефон: +7 (495) 952-72-22; Факс: +7 (495) 954-55-34
E-mail: petrosyan@sevin.ru
Адрес официального сайта в сети "Интернет":
<https://sev-in.ru/>
9 июня 2023 г.


Петросян Варос Гарегинович

Подпись Петросяна Вароса Гарегиновича
Заверяю: Ученый секретарь ИПЭЭ РАН
9 июня 2023 г.




Феоктистова Наталья Юрьевна