

### Отзыв официального оппонента

на диссертацию Бега Анны Геннадьевны «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).

Изучение механизмов формирования биоразнообразия является одной из важнейших эволюционно-биологических задач. Исследования отечественных и зарубежных научных групп свидетельствуют о существенном изменении обилия и видового состава природных сообществ в зонах умеренного и полярного климата, связанные с климатическими изменениями. Проведенные исследования показывают не только изменение видового состава, связанное с продвижением на север более теплолюбивых видов, но и смещение относительной обогатенности сообществ разными видами, имеющее в перспективе существенные последствия для всего биоценоза. Анализ генетической изменчивости нативных видов, демонстрирующих существенные изменения демографических характеристик, и инвазивных видов необходим для понимания возможных последствий таких изменений и создания прогностических моделей. Особенно актуальными становятся исследования инвазивных видов, являющихся природными резервуарами или переносчиками заболеваний, опасных для человека.

Работа Анны Геннадьевны Бега посвящена исследованию распространения и изменчивости комаров подрода *Stegomyia*, встречающихся на территории Российской Федерации. Набор видов, обитающих на изученной территории, включает *Ae. aegypti*; *Ae. albopictus*; *Ae. flavopictus*; *Ae. galloisi*; *Ae. sibiricus*; *Ae. cretinus*. Цель исследования строго определена в названии работы - изучение распространения, экологии и генетической изменчивости комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*, обитающих на территории Российской Федерации. Для достижения поставленной цели Автор решал следующие задачи: 1) уточнение границ ареалов распространения данных видов; 2) определение экологических предпочтений видов, в том числе и на личиночном возрасте; 3) выявление видоспецифических маркеров на уровне морфологических признаков и ДНК-баркодирования; 4) оценка генетической структуры синантропных популяций видов *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus*; 5) анализ последовательностей митохондрионов из природных популяций видов *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* и митохондрия *Ae. albopictus* из пересеваемой клеточной культуры С6/36. Цель и задачи полностью оправданы исходя из следующих данных. Детальное описание генетической структуры популяций показано только для видов *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*. Однако и для этих видов продолжающееся расширение ареала обитания на юге России требует дальнейшего анализа их генетической изменчивости. Для остальных видов описание генетической структуры крайне фрагментарно или не проводилось. Морфологические ключи для определения видовой принадлежности пар видов *Ae. albopictus* / *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* / *Ae. sibiricus* не позволяют провести надежную идентификацию вида, а методы ДНК-баркодирования для

определения видового статуса комаров подрода *Stegomyia* ранее не использовались. Все виды способны быть переносчиками арбовирусов, в том числе вызывающих лихорадки Западного Нила, Денге, Чикунгунья, Зика и Жёлтой, а вид *Ae. albopictus* паразитических нематод рода *Dirofilaria*. Таким образом, актуальность заявленной темы не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследования. Анна Геннадьевна провела комплексное исследование, и результаты, полученные при изучении биологии видов подрода *Stegomyia*, ареалов их распространения, видоспецифических морфологических признаков и молекулярных маркеров являются новыми и значимыми. Впервые исследована молекулярная изменчивость вида *Ae. sibiricus*, показано отсутствие дифференциации этого вида по изменчивости митохондриальных маркеров с видом *Ae. galloisi*. Впервые получен и проанализирован митохондрийон вида *Ae. sibiricus*. Для пар видов *Ae. albopictus* / *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* / *Ae. sibiricus* получены морфологические видоспецифические ключи по форме гипопигия самцов и его структур (бородавки коксита). На основе изученной молекулярной изменчивости последовательностей митохондриального генома видов подрода *Stegomyia* показана применимость метода ДНК-баркодирования для определения видового статуса четырех видов. Получены интересные и перспективные данные по пищевой базе личинок *Ae. albopictus*. Практическая значимость работы, в свете изложенных данных о переносимых данными видами инфекциях, также не вызывает сомнений. Полученные результаты вносят существенный вклад в эпидемиологические характеристики распространения арбовирусных инфекций.

Диссертация занимает 155 страниц текста, включает 326 литературных источников, проиллюстрирована 21 рисунком и 16-ю таблицами. Диссертация имеет стандартную структуру, представленную главами: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений» и «Список литературы».

«Обзор литературы» представлен на 24-х страницах, и разделен на три части. В первой части обзора Анна Геннадьевна приводит данные по общим характеристикам комаров подрода *Stegomyia* – морфологии имаго и личинок, в первую очередь уделяя внимание морфологическим структурам, несущим видоспецифические признаки, биологии видов, особенностям размножения и развития, поведения личинок и имаго, периодам активности имаго и предпочтительным условиям их обитания, их роли в трансмиссивной передаче арбовирусов.

Во второй части обзора Автор приводит характеристики всех шести изученных видов комаров. Во всех случаях приводится характеристика ареала обитания, описание экологических условий обитания вида, а при наличии синантропных и переходных форм – соответствующие им условия обитания, пищевого поведения и размножения, Анна Геннадьевна перечисляет характерные морфологические признаки видов, в том числе морфологические ключи, преимущественно связанные с копулятивным аппаратом самцов и используемые при определении вида. Приведены

последние литературные данные по инвазивным популяциям видов, возможным причинам их распространения и конкуренции с родственными видами. Проанализированы данные по документированным случаям распространения вирусных заболеваний, связанных с изученными видами, а для вида *Ae. albopictus* – дирофиляриоза, вызываемого паразитическими нематодами. Автор отмечает также адаптивность видов, связанную с формированием устойчивости к пониженным температурам и способностью впадать в диапаузу в холодное время года.

Последний раздел «Обзора литературы» посвящен использованию митохондриальных геномов в популяционных и эволюционных исследованиях. Автор указывает на преимущества и недостатки применения митохондриальных маркеров, объясняет сложности, связанные с наличием ядерных митохондриальных псевдогенов (NAMTs), кратко останавливается на структуре митохондриального генома. Завершая этот раздел, Анна Геннадьевна указывает на наличие в базе данных GenBank митохондриальных геномов четырех видов комаров подрода *Stegomyia*, два из которых не проаннотированы.

В главе «Материалы и методы» приведена информация по местам и методам сбора образцов, морфологическому анализу, методам изучения природных популяций, особенностям анализа экологических и биологических предпочтений вида *Ae. albopictus*, в том числе выборе мест для откладки яиц, скорости развития, особенностей пищевого поведения личинок, методам выделения ДНК и анализа последовательностей митохондрия, анализу последовательностей ДНК и статистическому анализу результатов. Используемый автором материально-методический аппарат полностью адекватен поставленным задачам.

Глава «Результаты» представлена четырьмя разделами. Структура изложения результатов в целом соответствует поставленным задачам. В первом разделе Автор приводит данные по сборам комаров на юге европейской части России, на Дальнем Востоке России, в Восточной и Западной Сибири. Относительное обилие видов оценивалось по количеству собранных образцов за 30 минут, при учете «на себе». Сборы осуществлялись с 2017 по 2021 гг. на Юге России и в 2020-2021 гг. на Дальнем Востоке и в Сибири, что позволило оценить изменение обилия видов и смещение границ ареалов их распространения за учитываемые периоды.

Во втором разделе Анна Геннадьевна приводит Характеристика природных популяций *Ae. albopictus*, включая суточную активность нападения самок и характеристики личиночных биотопов. Максимальная активность самок была отмечена в утренние часы – с 7 до 8 часов, и во вторую половину дня, с 15 до 19 часов. Личиночные биотопы в общем количестве 52 точек сбора оценивали по физико-химическим показателям воды и обилию и видовому составу личинок комаров. Сопоставляя характеристики среды обитания *Ae. albopictus* и контрольных видов *Cx. pipiens* и *An. plumbeus*, автор делает вывод, что кислотность воды и количество растворенного кислорода могут служить ограничительными факторами для развития личинок *Ae. albopictus*.

В третьем разделе главы приведены данные по результатам экспериментов, направленных на изучение экологических и биологических особенностей *Ae. albopictus*. При оценке выбора мест для откладки яиц было показано, что решающим фактором служил объем воды – от 1 до 10 литров, кислотности от 5 до 8 рН, солености 30 промилле, и минимальным количеством растворенной органики. Оценки влияния внешних факторов на продолжительность развития личинок показали, что чувствительным периодом развития к температуре (сезон учета скорости развития каждого из 4-х личиночных возрастов) является 4-й возраст. В условиях межвидовой конкуренции с *Cx. pipiens* жизнеспособность личинок *Ae. albopictus* в культурах была выше. Для оценки различий между наблюдаемыми результатами и теоретически ожидаемыми, использован критерий Пирсона. Для оценки различий долей комаров, доживших до определённой стадии развития в разных экспериментах проведено попарное их сравнение с помощью z-теста. При этом в тексте перечислены стадии с существенными различиями. Корректнее было бы привести значения критериев и p-значения, для всех сравнений. Особенно интересным представляется результат оценки пищевого поведения личинок *Ae. albopictus*. Хотя общепринятое мнение относит личинок кровососущих комаров к безвыборным фильтраторам. Автор показала, что до 45% личинок 4-го возраста *Ae. albopictus* и *Cx. pipiens* занимаются хищничеством, поедая личинок 1-го возраста, вне зависимости от видовой принадлежности. Причем до 10% личинок *Ae. albopictus* делают это регулярно, поедая за сутки от 3-х до 5-и личинок, тогда как подобная фракция личинок у *Cx. pipiens* отсутствовала. В какой степени такое поведение личинок детерминировано генетическими различиями «веганов» и «хищников», как такое поведение отражается на признаках и поведенческих характеристиках взрослых особей, представляется интересным вопросом, заслуживающим дальнейшего изучения.

Последний раздел результатов посвящен молекулярно-генетическим исследованиям комаров подрода *Stegomyia*. Автор приводит данные по митохондриальным гаплотипам гена *COI*, показывает на картах места сбора образцов и представляет NJ кладограмму BOLD фрагментов, построенную в программе MEGA-X. Гаплотипы, использованные при построении кладограммы, приведены в таблице 16. Оценка гаплотипической изменчивости популяций *Ae. albopictus* юга России позволяет заключить что инвазивные популяции Крыма произошли от популяции Новороссийска. Анна Геннадьевна показала чёткую кластеризацию *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. cretinus* и *Ae. flavopictus*, с высоким уровнем бутстреп-поддержки, и отсутствие дифференциации гаплотипов видов *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi*. Как было отмечено выше, такой результат свидетельствует о недавнем расхождении этих видов. Проанализированные гаплотипы видов *Ae. flavopictus* и *Ae. galloisi* Дальнего Востока России представлены в виде медианной сети, построенной в программе PopArt с применением стандартного алгоритма TCS. Ее структура заслуживает в перспективе дальнейшего анализа, с применением разметки всех замен, характеризующих переходы между гаплотипами. Полученная структура предполагает

наличие идентичных замен на параллельных ребрах, что свидетельствует об ошибках алгоритма, вызванных наличием сайтов с возвратными или конвергентными заменами (или «горячих точек мутагенеза», или «шума»), приводящих к удвоению ребер и формированию геометрических фигур в составе сети со сторонами, несущими гомологичные замены. В данном случае это не замечание, а рекомендация для дальнейшей работы с такими интересными данными.

Для проверки надежности сделанных выводов на основе анализа изменчивости фрагмента *COI*, Анна Геннадьевна повторяет кластерный анализ, но уже с полными последовательностями митохондрий, полученных лично для видов *Ae. flavopictus*, *Ae. sibiricus* и *Ae. albopictus*. В состав анализируемых последовательностей добавлены 12 публично доступных последовательностей полных митохондриальных геномов комаров подрода *Stegomyia* и последовательность митохондрия *An. gambiae* в качестве внешнего вида. И в этом случае виды кластеризовались внутри своих клад, а митохондрий *Ae. sibiricus*, размещенный в системе NCBI под названием *Ae. galloisi* (вид, обитающий в Японии), кластеризовался с этим видом, показывая величину средней эволюционной дивергенции  $d=0.01$ , что соответствует показателям *Ae. flavopictus* и *Ae. albopictus*. Можно предположить, что вид *Ae. sibiricus* представляет собой переоткрытый на территории России вид *Ae. galloisi*, описанный в Японии 100 лет назад. Используя полученные последовательности полных митохондриальных геномов, Анна Геннадьевна охарактеризовала эволюционную изменчивость кодирующих последовательностей митохондриальных геномов. Как и ожидалось, наибольший консерватизм проявляют гены цитохромоксидаз, за исключением гена *COIII*, а наибольшую изменчивость – гены наддегидрогеназ (*ND5* и *ND6*). Тем не менее, клада *Ae. galloisi/ Ae. sibiricus* показывает минимальную изменчивость, не позволяющую дифференцировать различия в накопившейся изменчивости генов *ND* и *COI*.

Завершает работу глава «Обсуждение», в котором Анна Геннадьевна предлагает варианты объяснения полученных результатов, по возможности сопоставляя их с литературными данными. Структура «Обсуждения» соответствует структуре изложения результатов в главе 3 – распространение видов, характеристика природных популяций *Ae. albopictus*, экологические и биологические особенности *Ae. albopictus*, молекулярно-генетические исследования комаров подрода *Stegomyia*. В «Обсуждении» Автор рассматривает проблему синантропизации, обосновывая синантропный статус вида *Ae. flavopictus* и частично синантропный – вида *Ae. sibiricus*, температурные ограничения, определяющие продвижение видов на север, и демографические характеристики популяций на выявленном ареале обитания. Обсуждая особенности биологии вида *Ae. albopictus*, Автор отмечает стратегию кормового поведения, связанную с активностью на протяжении светового дня, малым разлетом от мест выплода и низкой избирательностью зон для укуса. Анна Геннадьевна предполагает, что такое поведение связано с эволюционно-выработанной стратегией пищевого поведения в условиях нативного ареала вида – влажных тропиков и субтропиков, где существует постоянная тень, высокая

влажность и большое количество прокормителей. Обсуждая особенности биологии синантропных популяций *Ae. albopictus*, Анна Геннадьевна отмечает выбор самками мест для откладки яиц объемом до 10 литров как эволюционное новшество, связанное с отсутствием в природе открытых резервуаров средней емкости, при наличии мелких резервуаров (лужи, дупла) и больших водоемов. Избирательность самок *Ae. albopictus* при выборе мест откладки яиц свидетельствует о продолжающихся процессах адаптации в инвазивных популяциях – трофическая ниша *Ae. albopictus* остаётся узкой. Оценивая пищевое поведение личинок, Автор заключает, что *Ae. albopictus* имеет ряд адаптаций, помогающих ему успешно применять как интерференционную, так и эксплуатационную конкуренцию при взаимодействии с личинками других видов комаров. Результат молекулярно-генетического анализа изменчивости BOLD фрагмента, полученный в данном исследовании, позволяет Автору сделать вывод об однозначной пригодности фрагмента митохондриального гена COI в качестве метода видовой идентификации комаров подрода *Stegomyia*.

В «Заключении» Анна Геннадьевна обосновывает некоторые механизмы синантропизации инвазивных популяций комаров рода *Aedes* подрода *Stegomyia*. Протекающий в настоящий момент процесс синантропизации видов *Ae. flavopictus* и *Ae. sibiricus* на Дальнем Востоке России основан на имеющемся генетическом разнообразии в автохтонных популяциях комаров. Отбор в новых условиях приводит к формированию генетически однородных инвазивных популяций, обладающих минимально необходимым набором поведенческих, пищевых и физиологических адаптаций. Анна Геннадьевна отмечает также однозначную пригодность баркодирования для идентификации 5-и видов комаров подрода *Stegomyia*, и приоритет в получении и анализе митохондриального генома вида *Ae. sibiricus*.

Выводы работы хорошо согласуются с полученными результатами и соответствуют поставленным задачам. Представленная работа выполнена на солидном фактическом материале, убедительно обоснована и аргументирована, не имеет серьезных возражений по существу. Отмеченные погрешности ни в коей мере не умаляют общего значения данной работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен и проиллюстрирован.

А.Г. Бега выполнено новое исследование в области экологии, эволюционной и популяционной биологии. Анализ биологии, экологии и молекулярно-генетической изменчивости митохондриальных последовательностей близкородственных видов комаров подрода *Stegomyia* позволил сделать выводы о распространении и синантропизации данных видов, формировании в ходе распространения и синантропизации специфических поведенческих адаптаций, определить молекулярные и морфологические видоспецифические маркеры, оценить обедненную изменчивость синантропных популяций и на базе собственных последовательностей полного митохондриального генома и публично доступных данных определить гены *ND5* и *ND6* как обладающие наибольшей изменчивостью у видов *Ae. flavopictus* и *Ae.*



*albopictus*, и гены *COI*, *COII*, *ND5* и *NDI*, как обладающие наибольшей изменчивостью у видов *Ae. sibiricus* и *Ae. galloisi*.

А.Г. Бега самостоятельно выполнила сбор материала, экспериментальные работы и провела анализ полученных данных. Полученный материал представлен в 4-х публикациях в изданиях, рекомендованных ВАК, и апробирован на 10-и Российских и международных конференциях. Работа А.Г. Бега полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика и 1.5.15. – Экология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Куликов Алексей Михайлович -

доктор биологических наук,  
заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН),  
заведующий лабораторией эволюционной генетики развития  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26

Телефон: +7(499) 135-87-81, e-mail: [a.m.kulikov@idbras.ru](mailto:a.m.kulikov@idbras.ru) [amkulikov@gmail.com](mailto:amkulikov@gmail.com)

«Подпись А.М. Куликова удостоверяю»:

Ученый секретарь ИБР РАН,

к.б.н., доцент



М.Ю. Хабарова

29 мая 2023 г.