

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Быкова Романа Андреевича “Динамика инфицированности природных и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* разными генотипами эндосимбионта *Wolbachia*”, представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Изучение симбиотических сообществ относится к интереснейшим разделам биологии, рассматривающих взаимодействия между организмами разных видов. Обоюдно выгодные отношения увеличивают шансы обоих партнеров на выживание и даже могут закрепляться эволюционно в виде компонентов одной биологической системы. Изучение тонких механизмов этого явления и его последствий представляют интерес для специалистов многих областей - от генетики и молекулярной биологии до эволюции.

Эндосимбиоз является разновидностью симбиоза, когда один из партнеров может жить только внутри клетки другого. Примером служит бактерия *Wolbachia*, обнаруженная в клетках огромного множества наземных беспозвоночных. Так доля инфицированных *Wolbachia* видов членистоногих может составлять 3/4. Эта бактерия передается строго вертикально по материнской линии. Трудно однозначно сказать, кем она является – вредным паразитом, комменсалом или полезным симбиотом. Известно, что *Wolbachia* способна индуцировать у вида-хозяина различные репродуктивные аномалии, обеспечивая себе возможность быстрого распространения в популяциях, с другой стороны, существуют примеры мутуалистического влияния. Молекулярные механизмы таких воздействий остаются мало изученными.

Возникают вопросы о причинах и факторах, вызывающих столь быстрое распространение этой бактерии в популяциях. Для ответа на них необходимо выбрать удобный для исследований в природных и лабораторных условиях объект. Таковым, по мнению автора диссертации, является *Drosophila melanogaster* один из видов-хозяев *Wolbachia*. Это популярный модельный объект, с которым можно проводить эксперименты в контролируемых лабораторных условиях и для которого на сегодняшний день имеются многочисленные молекулярно-генетические данные. Проведенные разными авторами исследования инфицированности популяций мух бактерией показали, что, во-первых, природные популяции *D. melanogaster* по всему миру инфицированы ей, но с разной частотой (от 20 до 100%); во-вторых, в популяциях наблюдалось генотипическое разнообразие *Wolbachia* - wMel, wMelCS, wMelCS2, wMel2 и wMel3, причем наиболее распространенным генотипом являлся wMel, а остальные редко встречались, либо были

обнаружены только в некоторых регионах; в-третьих, периодичное исследование зараженности популяций в выявило факты замещения генотипа wMelCS на wMel; в четвертых, было обнаружено устойчивое наследование определенных митотипов *D. melanogaster* с определенными гаплотипами *Wolbachia*; в пятых, в линиях *D. melanogaster* из мировых фондов устойчиво сохранялась инфицированность.

Возникают вопросы, насколько такие закономерности являются общими и для природных популяций *D. melanogaster* Евразии, насколько стабильны и разнообразны характеристики инфицированности лабораторных линий, какие механизмы обуславливают динамику распространения *Wolbachia*. Важность комплексных молекулярно-генетических исследований таких проблем заключается и в том, что известные на сегодняшний день факторы, влияющие на скорость распространения бактерии, такие как цитоплазматическая несовместимость (ЦН) и мутуалистическое влияние *Wolbachia* на *D. melanogaster* достаточно слабы и не объясняют столь частое обнаружение бактерии в популяциях. Именно решению таких чрезвычайно актуальных проблем и посвящена работа Быкова Р.А.

Структура диссертации. Диссертация написана в традиционном стиле на 135 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы из 201 наименований, из которых 18 на русском, а остальные на английском языке.

Во **введении** автор кратко и содержательно пишет об актуальности данного исследования, новизне и значении полученных результатов. Не вызывает сомнения важность поставленной цели и конкретных задач исследования. Приводит данные об апробации работы на различных форумах и выходные данные печатных работ по теме диссертации. Указывает личный вклад, который без сомнения весом.

Раздел **«Обзор литературы»**, читается легко и с интересом. В конце главы Быков Р.А. удачно приводит обобщение имеющихся фактов, касающихся *Wolbachia-D. melanogaster*, и очерчивает круг вопросов, которые будут рассмотрены в диссертационной работе далее.

В главе **«Материалы и методы»** подробно описаны процедура сбора популяционного материала в регионах Евразии и отбора экспериментального материала из линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. Исследования полученных образцов на принадлежность к определенному цитотипу проводили с использованием современных методов молекулярного анализа. Заслуживает внимания оригинальная постановка эксперимента по анализу динамики инфицированности ящичных популяций *D. melanogaster* бактерией двух генотипов wMel и wMelCS. В целом

Быковым Р.А. были использованы адекватные современные методы исследования для решения поставленных задач.

В разделе «**Результаты**» можно выделить три логически связанные, но достаточно независимые части. В первой приводятся данные об инфицированности популяций *D. melanogaster* Евразии за период 2008-2013 симбиотической бактерией *Wolbachie*. Несомненным достоинством этих исследований является впервые примененный комплексный метод анализа, когда устанавливается не только зараженность популяции бактериями определённого генотипа, но и проверяется гаплотип мтДНК *D. melanogaster* у незараженных особей. Это позволило автору более полно описать динамику зараженности. Учитывая большую коллекцию собранных мух (836 изосамочьих линий), а так же среднюю по численности выборку мух в отдельных регионах (около 20) достоверность результатов не вызывает сомнения. Впервые в этих исследованиях и только у мух полуострова Синай был обнаружен новый генотип *Wolbachie* - wMel4 (частота 29%). Обобщением результатов явилась впервые данная автором оценка цитотипического разнообразия в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии: все популяции заражены с частотой от 33 до 88%; обнаружены все четыре генотипа бактерии wMel, wMelCS, wMelCS2 и wMel4; наиболее распространен генотип wMel (97%) и ассоциированный с генопипом wMel митотип «М» (99%).

Во второй части главы «**Результаты**» было исследовано цитотипическое разнообразие лабораторных линий *D. melanogaster*. Этот анализ при сравнении с популяционными данными может косвенно свидетельствовать о динамике замещения одного генотипа на другой (например wMelCS на wMel), поскольку многие линии были получены на основе диких мух, представляющих более ранние по времени популяции. Впервые Быковым Р.А. был проведен подробный анализ большой коллекции мутантных линий *D. melanogaster* фонда лаборатории. Автором получены уникальные данные, позволившие ему оценить частоту инфицированности, которая оказалась значительно меньше, чем в природных популяциях (около 39%). В лабораторных линиях бактерия была представлена тремя генотипами wMel, wMelCS, wMelCS2 с частотами 17, 4 и 18, и двумя митотипы «М» и «S» с частотой 20% и 40% (сравнить с частотой в диких wMel (97%) и митотип «М» (99%)). Анализируя наблюдаемые различия Быков Р.А. справедливо считает, что это объясняется историей ведения линий в лаборатории. А следовательно, сохранением характеристик основателей линий. Таким образом, инфицированность мух бактерией *Wolbachie* с разными генотипами может прочно фиксироваться в ряду поколений при неизменных генетических и природных условиях. Достоверность и научная новизна результатов не вызывает сомнений.

В третьей части главы «**Результаты**» диссертант пытается ответить на вопрос о возможных причинах замена одного генотипа бактерии у *D. melanogaster* на другой, и проанализировать вклад известных факторов, влияющих на этот процесс – ЦН и плодовитость. Была проведена серия у экспериментов с ящичными популяциями *D. melanogaster*. Автор анализировал четыре популяции: (1) присутствуют зараженные самки и самцы (M-Mel и S-SC); (2) мухи заражены M-Mel и нет - S-w-; (3) инфицированы S-SC и неинфицированные M-w- ; (4) контрольное скрещивание, где мухи не содержали *Wolbachie* (M-w- и S-w-) . В 11-ти последовательных неперекрывающихся поколениях было подсчитано число потомков, исследована частота инфицированности бактерией с определенным генотипом и определена частота каждого митотипа у незараженных особей. Также было собрано и проанализировано 20-е поколение, полученное после 11-го свободным скрещиванием дрозофил. Результаты анализа автор представил в виде графиков. Дополнительно для этих генотипов были построены графики, основанные на использовании математической модели, применяемой для расчета частоты цитотипа в текущий и последующий моменты времени для природных популяций с учетом влияния тех или иных факторов на динамику распространения бактерии. В дальнейшем автор сравнил рассчитанные и полученные в экспериментах данные. Итогом экспериментального моделирования природных условий (особи инфицированные и неинфицированные) впервые было показано увеличение в течение 20 поколений доли инфицированных особей wMel и wMelCS с 50 до 83 и 78 % соответственно, также преобладание особей, несущих wMel-генотип над мухами с wMelCS-генотипом (половина мух имела бактерию wMel-генотип, а вторая - wMelCS-генотипом), причем конечные частоты генотипов в опытах были сопоставимы с частотами в природе. Однако именно индивидуальный анализ особей в потомстве от каждого скрещивания на протяжении 11-ти поколений позволил автору обнаружить скачкообразные увеличения частот инфицированности у потомков определенных поколений. После этого события соотношение частот почти не менялось, а в 20-м поколении могло и уменьшиться. Анализ влияния разных факторов на динамику инфицированности не выявил действия *Wolbachie* на плодовитость. Отсутствовало и влияние митотипа *D. melanogaster* на динамику цитотипов. Итогом всестороннего анализа данных стало сделанное Быковым Р.А. важное заключение, что в экспериментальных условиях на частоту инфицированности влияет дрейф генов и возможно ЦН, а причиной широкого распространения бактерии в природе, кроме прочих факторов, являются условия среды, наличие ЦН и генетические факторы. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, поскольку в каждом

поколении анализировали большую выборку мух от 60 до 120 особей, а условия среды были одинаковыми во всех случаях.

Принципиальных замечаний по поводу постановки экспериментов и анализу результатов у меня нет, тем не менее стоит отметить следующие моменты:

1. Автор оценивает влияние ЦН основываясь на математической модели, хотя довольно просто оценить ЦН и плодовитость самок во всех скрещиваниях путем подсчета отложенных яиц и вылупившихся личинок, используя чашки Петри с кормом;
2. Интересно было бы сравнить динамику инфицированности *Wolbachie* разных генотипов в популяциях на одном генотипе *D. melanogaster* (контроль и опыт).

Глава «**Обсуждение**» прекрасно написана и действительно всесторонне обсуждает полученные автором и имеющиеся в литературе данные, что позволяет высоко оценить проделанную автором экспериментальную и теоретическую работу.

Глава «**Выводы**». По результатам работы четко и ясно сформулировано 6 выводов, полностью отражающие итоги проведенных исследований.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

В целом диссертация представляет собой законченное исследование на актуальную тему и демонстрирует высокий уровень квалификации соискателя, который использует современные молекулярно-генетические методы исследования для анализа динамики инфицированности бактерией *Wolbachie* природных популяций и лабораторных линий *D. melanogaster*, разрабатывает оригинальные методики для выявления общих закономерностей в лабораторных условиях и умеет корректно анализировать полученные результаты. Выводы, сделанные Быковым Р.А, аргументированы, достоверны и полностью соответствуют полученным автором экспериментальным данным, и, несомненно, обладают новизной и имеют практическую ценность, поскольку позволяют лучше понять механизм взаимоотношений внутри симбиотической системы *Wolbachie*- *D. melanogaster* и учитывать такие взаимоотношения при планировании и постановке экспериментов с использованием лабораторных тестовых линий. Материал, представленный в данной работе, опубликован в 3-х журналах, входящих в список ВАК, и доложен на многих конференциях.

Итак, представленная Быковым Р.А. диссертационная работа “Динамика инфицированности природных и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster*

разными генотипами эндосимбионта *Wolbachia*» полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским (п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства №842РФ от 24.09.2013), а Быков Р.А. достоин присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика»

Похолкова Галина Витальевна

Доктор биологических наук,

старший научный сотрудник

лаборатории молекулярной цитогенетики,

ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева 8/2

galina@mcb.nsc.ru

363-90-58

Похолкова Г.В.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской Академии наук
Подпись Похолкова Г.В.
Имённый секретарь Козлова Е.В.
12.09.2015 г.