

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**
(ФАНО РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**Институт цитологии
Российской академии наук**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-03-41

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу
(Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с 20726Ц41010,
р/с 40501810300002000001,
Северо-Западное ГУ Банка России
БИК 044030001

12.09.2014 г. № 12316-662-290

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

академик  Н.Н. Никольский

«12» сентября 2014 года

О Т З Ы В

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук – о диссертации ЗЛАТОГУРСКОГО Василия Владимировича «Разнообразии и эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников (Protista: Centrohelida)», представленной к защите в совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д212.232.08 при Санкт-Петербургском государственном университете на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 – зоология.

Актуальность исследования

Центрохелидные солнечники (Centrohelida Kühn, 1926) – весьма распространенная в различных водных биоценозах группа низших эукариотных организмов, включающая в настоящее время около ста морских и пресноводных видов. Однако есть все основания считать, что в действительности разнообразие этой группы охарактеризовано крайне неполно. В составе Centrohelida оказалось большинство видов, входивших ранее в состав таксона Heliozoa (Haesckel, 1866), полифилетичность которого на настоящий момент не вызывает сомнений. Идентификация видов этой группы производится с позиций морфологической концепции вида, на основании морфологии специфических покровных структур – спикул и кремниевых чешуек разнообразной формы. Однако до сих пор нет данных о том, насколько стабильны эти скелетные элементы внутри одного клона, и может ли один и тот же вид иметь разный набор чешуек на разных стадиях жизненного цикла. Очевидно также, что сегодня система центрохелидных солнечников, основанная исключительно на морфологических данных, нуждается в проверке молекулярно-филогенетическими методами. Имеющиеся в настоящее время немногочисленные молекулярно-биологические данные во многом не соответствуют традиционным представлениям о путях эволюции представителей этой группы низших эукариот.

Цель исследования формулируется В.В. Златогурским следующим образом: «изучить разнообразие и пути эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников». Проведенные автором исследования полностью соответствуют поставленной цели.

Задачи исследования определены четко и исчерпывающе. Было намечено: (1) Изолировать штаммы центрохелидных солнечников из различных местообитаний, установить их в накопительных или клональных культурах. (2) Изучить обнаруженные

виды методами световой и электронной микроскопии, секвенировать ген 18S рРНК; на основании этих данных идентифицировать уже известные или описать новые для науки виды. (3) В клональных культурах изучить стабильность покровных структур у центрохелидных солнечников, уделяя особое внимание строению покровов на разных стадиях жизненного цикла. (4) Провести молекулярно-филогенетический анализ полученных данных, по его результатам реконструировать возможные паттерны эволюции покровных структур центрохелидных солнечников и оценить надежность использования деталей строения покровов при разработке системы этой группы».

Научная новизна

Несомненная научная новизна работы заключается в комплексном использовании автором как морфологических, так и молекулярно-филогенетических методов для изучения центрохелидных солнечников. Кроме того, впервые в рамках такого исследования были широко использованы клональные культуры этих организмов, выделенных преимущественно самим автором из различных, географически весьма удаленных друг от друга местообитаний.

Теоретическое и практическое значение

Исследование В.В. Златогурского имеет важное научное значение и существенно пополняет и уточняет имевшиеся до сих пор весьма скудные и фрагментарные сведения о биоразнообразии центрохелидных солнечников, дает новые представления об организации и эволюции характерных поверхностных структур – спикул и тангентальных чешуек, о филогении и систематике этой группы одноклеточных организмов. Автор разрабатывает систему идентификации солнечников путем калибровки молекулярных и морфологических критериев, на основании которой, в частности, он описывает 12 новых для науки видов.

Результаты диссертационной работы уже нашли свое применение и используются в специальных учебных курсах на Кафедре зоологии беспозвоночных СПбГУ.

Личный вклад соискателя

Все исследовательские процедуры и обработка результатов работы выполнены диссертантом лично. В.В. Златогурский является единственным автором всех семи публикаций по материалам диссертации.

Соответствие диссертации требованиям Положения о порядке присуждения учёных степеней

Диссертационная работа В.В. Златогурского полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» 2013 г.).

Оценка содержания диссертации

Структура диссертации в целом обычна. За традиционным «Введением» следует «Обзор литературы» (с. 10–34), в котором вначале дается описание систематического

положения, особенностей морфологии, в т.ч. ультраструктуры центрохелидных солнечников. Отмечается, что филогенетическое положение центрохелидных солнечников на древе эукариот на настоящий момент не установлено с достаточной долей надёжности (с. 14). В отдельном подразделе детально описываются покровные структуры – спиккулы и пластинчатые кремнезёмные чешуйки, а также дополнительные типы чешуек, появляющиеся при инцистировании. Далее излагаются существующие представления об эволюции покровных образований солнечников. Здесь хотелось бы особо отметить рис. 6 – «Гипотетическая схема эволюции покровных структур у центрохелид на основании морфологических данных (по разным авторам)». Далее представлена молекулярная филогения центрохелид, схема Кавалье-Смита (не постепенное приобретение новых типов чешуек, а их постепенная утрата, с. 25), критика диссертантом этой схемы (с. 26–27). Обзор литературы заканчивается подразделом «Систематический обзор центрохелидных солнечников».

В целом обзор литературы написан хорошо, компактно, очень по теме (только то, что нужно для дальнейшего). Хорошие иллюстрации, чёткий, грамотный язык. Традиционный недостаток обзора – отсутствие заключительной части, подводящей читателя к обоснованию цели собственного исследования.

Глава 2 «Материал и методы» свидетельствует об очень значительном объеме материала, собранного и тщательным образом обработанного автором, полученного из различных водоемов северо-запада России, Дании, Швейцарии, крайнего севера России, Дальнего Востока России, а также Южной Африки (всего 97 проб, из которых в 30 были найдены солнечники). Однако остается не вполне ясным, какое же именно число штаммов и видов солнечников было в конечном итоге исследовано автором, поскольку соответствующие данные в диссертации и автореферате не совпадают. Так, в тексте диссертации указано: «... Из них 20 штаммов, относящихся к 17 видам ... были выделены в чистую клональную культуру... Ещё 4 вида были исследованы в накопительных культурах» (с. 35). В автореферате: «... 19 из них выделены в чистую клональную культуру. Всего в работе изучено 19 видов...» (с. 16).

Набор использованных методов широк и вполне соответствует современному мировому уровню протистологических исследований: это хорошего качества световая микроскопия, электронная (сканирующая) микроскопия и энергодисперсионный рентгеновский анализ, морфометрия, изоляция геномной ДНК из клеток с помощью гуанидин-изотиоцианатного метода, амплификация гена малой субъединицы рРНК (праймеры заказные), прямое секвенирование или клонирование продуктов ПЦР при помощи вектора pTZ57R/T, реконструкция филогенетических деревьев на основе набора выровненных последовательностей и их тестирование бутстрэп-методом.

Полученные результаты и их обсуждение представлены в **Главе 3** диссертации (с. 47–119). Этот раздел начинается, по существу, с довольно просторного (с.47–49) общего резюме (или заключения) всей диссертации, что не совсем обычно (пример этого можно найти на с. 48). Сама же глава делится на следующие разделы. 3.1 «Изучение цистных чешуек *Raineriophrys erinaceoides* и *Raphidiophrys heterophryoidea*». Здесь, в частности, отмечается, что автором впервые описано формирование мозаичного слоя покровных чешуек – уникальный признак, который ранее не был описан ни для центрохелидных

солнечников, ни для каких-либо других протистов. Далее идет раздел 3.2 «Сравнение ко-специфичных штаммов из удалённых местообитаний». Вывод из этого раздела таков: «... при наличии уверенности, что мы имеем дело с чешуйками трофической стадии, а не с чешуйками цисты, описание и идентификация видов может осуществляться на основе морфологических данных». Раздел 3.3 посвящен сравнению симбионт-содержащих штаммов солнечныхников с бесцветными (*Acanthocystis penardi* Wailes, 1925; *Acanthocystis turfacea* Carter, 1863). Подтвердились более ранние наблюдения, что бесцветные солнечники определённо мельче (и их чешуйки тоже). Однако другие ли это виды, должно показать, по мнению автора, выделение дополнительных штаммов и их распределение на молекулярно-филогенетических деревьях. Здесь можно выразить сожаление, почему в работе с симбионт-содержащими штаммами не были предприняты попытки освободить солнечныхников от симбионтов и провести соответствующее сравнение бесцветных с апосимбионтными формами. Раздел 3.4 посвящен выяснению «Статуса *Acanthocystis trifurca* Nicholls, 1983 и *A. myriospina* Penard, 1890», а раздел 3.5 – «Независимому возникновению солнечныхников только с тангентальными кремниевыми чешуйками». В последнем разделе автор приходит к выводу, что «данный модус покровных образований – тангентальные кремниевые чешуйки, но без радиальных, возник в двух отрядах центрохелид совершенно независимо и не является уникальным, как это было показано ранее и для других типов покровных структур» (с. 90). В разделе 3.6 автор представляет вид *Raphidiophrys heterophryoidea* Zlatogursky, 2012, который демонстрирует переходный тип строения покровных структур между родами *Raphidiophrys* и *Choanocystis*. Помимо тангентальных кремниевых чешуек в состав его покровов входят также радиальные элементы веретеновидной формы. Данные проведенного диссертантом энергодисперсионного рентгеновского анализа показали, что радиальные элементы в данном случае представляют собой не что иное, как спикулы. Таким образом, *R. heterophryoidea* демонстрирует не только первый известный случай сочетания простых веретеновидных и сложных скульптурированных скелетных элементов, но и первый известный случай сочетания кремниевых чешуек и спикул в пределах одного организма. Раздел 3.7 называется «Утрата кремнификации чешуек в пределах родов *Acanthocystis* и *Polyplacocystis*», а в заключительном разделе 3.8 («Диагнозы таксонов») для каждого таксона дается описание и дифференциальный диагноз, в том числе 12 новых для науки видов центрохелидных солнечныхников. Наконец, глава 3 заканчивается небольшим самостоятельным подразделом «Основные полученные результаты», где в очень сжатом виде приведены результаты проведенного диссертантом исследования.

Таким образом, в главе 3 диссертации представлены полученные автором результаты, дающие ответы на поставленные им цели и задачи исследования и существенно обогащающие наши знания о разнообразии и эволюции покровных структур у центрохелидных солнечныхников, а также систематике и филогении этой своеобразной группы низших эукариотных организмов. Специально хочется отметить превосходные, оригинальные микрофотографии, иллюстрирующие эту часть диссертации.

Затем следуют **4 вывода**, имеющих достаточно общий характер, и, наконец, **Заключение**, в котором автор, на основании полученных им результатов, излагает основные требования к критериям, используемым при описании и идентификации видов центрохелидных солнечныхников (клональные культуры и изучение покровов на разных

стадиях жизненного цикла; комбинирование данных по морфологии чешуек с результатами молекулярно-филогенетического анализа). Выделение, наряду с присутствием таких разделов как «Основные полученные результаты» и «Выводы», еще и «Заключения» необычно, это можно оспаривать, однако оно отнюдь не мешает чтению.

Далее следуют «Благодарности» и «Список литературы» (99 названий, из них 10 на русском языке), достаточно полно охватывающий всю необходимую литературу по теме диссертации.

Замечания к работе

В целом диссертация не вызывает сколько-нибудь серьезных вопросов и замечаний. Кроме тех частных случаев, которые уже были упомянуты выше, хотелось бы высказать сожаление, что в методическом арсенале автора при описании новых видов отсутствует трансмиссионная электронная микроскопия. Действительно, специфика группы такова, что полноценное морфологическое описание организмов фактически заменяется описанием покровных структур клеток. Тем не менее, весьма желательно было бы иметь максимально полные сведения о тонком строении клеток новых для науки видов, к тому же нельзя исключать, что при этом будут выявлены какие-то морфологические детали и особенности, полезные в качестве систематических признаков, как это имеет место во многих других крупных таксонах одноклеточных организмов.

Диссертация, как уже было сказано выше, и автореферат написаны хорошим, четким и лаконичным языком. Имеются, конечно же, опечатки, сравнительно немногочисленные, но затрудняющие чтение (с. 16, 24, 43, 82 и др.). В автореферате их значительно больше. Автор довольно вольно относится к пунктуации, в частности к расстановке запятых. И дело не в незнании правил, ибо рядом стоящие одинаковые грамматические конструкции пунктуационно оформляются по-разному. Встречаются явно жаргонные термины: «Для изоляции ДНК клетки в буфере коротко *вортексировали...*» (с. 44), «...давали получившемуся *пеллету* подсохнуть...» (с. 45, курсив наш). Правильно ли грамматически выражение: «Клетки *покрыты двумя типами радиальных и одним типом пластинчатых чешуек*» (с. 69, курсив наш)? Нельзя, наконец, не отметить, что автор несколько злоупотребляет возвратными формами глаголов.

По теме диссертации опубликовано 7 работ. Из них 3 статьи в журналах из списка рекомендованного ВАК, в том числе 3 на английском языке в журналах WOS.

Заключение

Диссертационная работа ЗЛАТОГУРСКОГО Василия Владимировича «Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных солнечников (Protista: Centrohelida)» представляет собой оригинальное, законченное (в рамках поставленных задач) научно-квалификационное исследование. По своей актуальности, новизне и значимости для науки работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» 2013 г.). Основные результаты исследования достаточно полно представлены на двух международных конгрессах, в автореферате и в 7 научных публикациях. Автор

диссертации, Златогурский В.В., безусловно заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 – зоология.

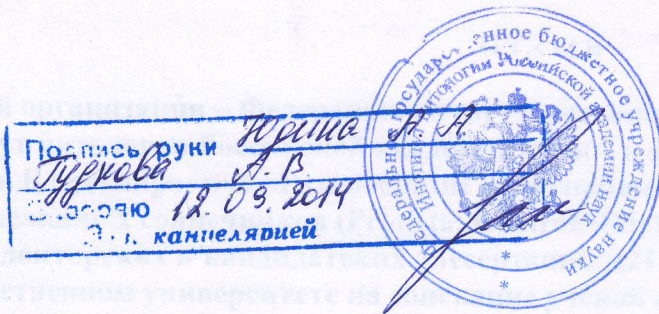
Диссертационная работа ЗЛАТОГУРСКОГО Василия Владимировича «Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных солнечников (Protista: Centrohelida)» и настоящий отзыв обсуждены и одобрены на заседании лаборатории цитологии одноклеточных организмов ИНЦ РАН (протокол № 5 от «10» сентября 2014 г.).

Главный научный сотрудник
лаборатории цитологии одноклеточных ИНЦ РАН
профессор, д.б.н.

А.Л. Юдин

Ведущий научный сотрудник
лаборатории цитологии одноклеточных ИНЦ РАН
к.б.н.

А.В. Гудков



Актуальность исследования

Центрохелидные солнечники (Centrohelidae Kuhn, 1926) – весьма распространённая и разнообразная группа биологических групп низших эукариотных организмов, аккомодация в настоящее время обитает в морских и пресноводных водах. Однако есть все основания считать, что в действительности разнообразие этой группы характеризуется крайне высоким. В составе Centrohelidae охватывается большинство видов, включённых ранее в состав таксона Heliozoa (Haeckel, 1866), наличие которых на настоящий момент не вызывает сомнений. Идентификация видов этой группы, однако, имеет в истории морфологической классификации виды, на основании морфологических признаков покровных структур – выростов и краевых желобчатых образований формы. Однако до сих пор нет данных о том, насколько стабильны эти скелетные элементы внутри одного клона, и может ли один и тот же вид иметь разный набор черт на разных стадиях жизненного цикла. Очевидно также, что в годия система центрохелидных солнечников, основанная исключительно на морфологических данных, нуждается в проверке молекулярно-филогенетическими методами. Имеющиеся в настоящее время молекулярно-филогенетические данные во многом не соответствуют традиционным представлениям о путях эволюции представителей этой группы низших эукариот.

Цель исследования формулируется В.В. Златогурским следующим образом: «Изучить разнообразие и пути эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников». Предметные автором исследования полностью соответствуют поставленной цели.

Задачи исследования определены четко и исчерпывающе. Бegan перечислено: (1) Изучить пути эволюции центрохелидных солнечников из различных местообитаний, установить их в ископаемых и современных формах. (2) Изучить обнаруженные