

На правах рукописи

**ЗЛАТОГУРСКИЙ**  
Василий Владимирович

**Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных  
солнечников (Protista: Centrohelida)**

Специальность 03.02.04 — зоология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2014

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном университете (СПбГУ)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент Смирнов Алексей Валерьевич, Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных.

Официальные оппоненты:

Фролов Александр Олегович – доктор биологических наук, Зоологический институт РАН, лаборатория протозоологии, ведущий научный сотрудник

Мыльников Александр Петрович - доктор биологических наук, Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, лаборатория микробиологии, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Институт цитологии РАН.

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. в 18.00 часов на заседании совета Д 212.232.08 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском Государственном Университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная д.7/9, ауд.133.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Горького СПбГУ.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук \_\_\_\_\_ Н.В. Балеева.

## Общая характеристика работы

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Центрохелидные солнечники (*Centrohelida* Kühn, 1926) – это таксон протистов, объединяющий более ста морских и пресноводных видов. В составе этой группы оказалось большинство видов, ранее включавшихся в состав таксона *Heliozoa* (Naeskel, 1866) полифилетичность которого на настоящий момент убедительно показана как на основании морфологических данных (Smith, Patterson, 1986) так и с использованием молекулярно-филогенетических методов (Nikolaev et al., 2004). Описание и идентификация видов центрохелидных солнечников, а также выделение таксонов более высокого ранга в пределах этой группы протистов на настоящий момент ведётся на основании морфологии покровных структур, которые у большинства видов представляют собой либо органические веретеновидные элементы – **спикулы**, либо **кремниевые чешуйки**, имеющие разнообразную форму (Микрюков, 2002; Siemensma, 1991). Высокий процент новых видов практически в любом достаточно объёмном исследовании с применением электронной микроскопии, а также большое количество не идентифицированных сиквенсов при секвенировании тотальной ДНК, выделенной из природных местообитаний, говорит о том, что разнообразие этой группы пока охарактеризовано крайне неполно (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007). Нет данных о том, насколько стабильны скелетные элементы внутри одного клона, и может ли один и тот же вид солнечника обладать разными наборами чешуек на различных стадиях жизненного цикла. Имеющаяся система центрохелидных солнечников основана исключительно на морфологических данных и нуждается в проверке молекулярно-филогенетическими методами.

Другим важным аспектом изучения покровных структур центрохелидных солнечников является реконструкция основных эволюционных преобразований этих структур. Предположения об эволюции покровов солнечников, которые основывались исключительно на морфологических данных, не выдержали проверки молекулярно-филогенетическими методами. Вместо интуитивно понятной схемы постепенного усложнения покровных структур (Микрюков, 2002; Dürrschmidt, Patterson, 1987) молекулярная филогенетика демонстрирует вторичное возникновение многих более простых признаков, а также редукцию многих структур, вплоть до полной утраты покровных образований – например, у представителей рода *Oxnerella* (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007; Cavalier-Smith, Chao, 2012). До сих пор многие роды солнечников, сильно отличающиеся по строению покровов, не исследованы молекулярными методами, и их положение в филогенетическом древе не ясно. Для создания современной картины эволюции покровных структур необходимо комплексное исследование представителей различных таксонов центрохелид.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы — изучить разнообразие и пути эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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 работы.** На настоящий момент наиболее значимыми проблемами в исследовании центрохелидных солнечников являются фрагментарность и скудность работ по этой весьма широко распространённой в биоценозах группе, а также разрыв между морфологическими и молекулярно-генетическими данными в работах, посвящённых центрохелидам. Большинство работ второй половины XX века (Nicholls, 1983; Nicholls, Dürrschmidt, 1985; Dürrschmidt, 1985, 1987a, 1987b), нашедших своё обобщение в сводках Сиенсмса (Siemensma, 1991) и Микрюкова (Микрюков, 2002), не содержат молекулярно-генетических данных и описывают, как правило, лишь ультраструктурные особенности покровов тех или иных видов солнечников. Группа Томаса Кавалье-Смита в своих работах (Cavalier-Smith, Chao, 2003, 2012; Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007), напротив, в основном уделяет внимание молекулярно-филогенетическим аспектам, в то время как морфологические данные в работах этих авторов фрагментарны или отсутствуют. Между тем, для разрешения таких ключевых проблем как филогенетическое родство солнечников со сходными покровами, стабильность покровных структур в пределах клона, эволюция покровных структур совершенно необходимо выделение клональных культур солнечников, которые затем должны быть изучены с применением всего комплекса как морфологических, так и молекулярно-филогенетических методов. Именно такие исследования и были впервые проведены в рамках данной работы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Биоразнообразие центрохелидных солнечников изучено в значительной мере недостаточно; чешуйки трофических стадий центрохелидных солнечников не являются единственным и достаточным признаком для идентификации видов.

2. Группировка видов в роды и семейства исключительно на основании строения скелетных элементов может не соответствовать филогенетическим отношениям между видами.

3. Солнечники, обладающие только спикулами или только тангентальными чешуйками, возникают в процессе эволюции покровов центрохелидных солнечных не неоднократно и независимо в разных филогенетических ветвях; спикулы и тангентальные чешуйки могут сочетаться у одного организма.

**Теоретическая и практическая значимость.** Центрохелидные солнечники обитают как в планктоне (Canter, 1966; Arndt, 1993; Stensdotter-Blomberg, 1998), так и в бентосе (Dürtschmidt, 1985; Siemensma and Roijackers, 1988; a, b Mikrjukov, 1993) различных водоёмов. Во многих из них эти организмы достигают значительной численности: до  $5 \cdot 10^3$  клеток / л<sup>-1</sup> в морских заливах, до  $3,5 \cdot 10^3$  клеток / л<sup>-1</sup> в пресноводных озёрах, до  $8,5 \cdot 10^3$  клеток / л<sup>-1</sup> в реках и до  $7 \cdot 10^3$  клеток / л<sup>-1</sup> в озёрах с высокой кислотностью (Pierce, Coats, 1999; Biyu, 2000; Bell et al., 2006; Kiss et al., 2009). При этом биомасса солнечных может достигать 30 % от общей биомассы протистов (Stensdotter-Blomberg, 1998). Показано также, что солнечники играют важную роль в пищевых цепях водоёмов. Будучи хищниками, они могут осуществлять контроль численности других мелких организмов: бактерий, жгутиконосцев, инфузорий (Pierce, Coats, 1999; Bell et al., 2006). Именно поэтому солнечных абсолютно необходимо учитывать при комплексных исследованиях микробных сообществ, однако число подобных работ до сих пор очень невелико. На настоящий момент данные об этой группе фрагментарны и по оценкам на основании секвенирования тотальной ДНК, выделенной из природных местообитаний, биоразнообразие солнечных охарактеризовано пока лишь на 10% (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007). Очевидна необходимость описания новых видов, разработки системы идентификации солнечных путём калибровки молекулярных и морфологических критериев.

Результаты данного исследования используются в курсах, реализуемых на кафедре зоологии беспозвоночных СПбГУ, а именно: «Протисты: клетка-организм», «Зоологические киноэкскурсии», «Разнообразие живого: протисты».

**Апробации.** Результаты работы были доложены на Европейском Протистологическом конгрессе, Берлин, Германия (2011), Международном Съезде общества протистологов, Осло, Норвегия (2012) и Международном Протистологическом конгрессе, Ванкувер, Канада (2013), а также на научных семинарах кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ.

**Публикации.** 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.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю А. В. Смирнову, А. А. Добровольскому, А. П. Мыльникову и всему коллективу кафедры зоологии беспозвоночных за неоценимую помощь в подготовке работы. Отдельная

благодарность А. А. Гловой, Ф. Е. Четверикову и Т. Чужековой за предоставленные пробы из удалённых местообитаний. Исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Вычислительные технологии» а также «Междисциплинарного ресурсного Центра по направлению Нанотехнологии» при поддержке проекта РФФИ № 12-04-31982-мол\_а, а также грантов Санкт-Петербургского университета.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, трёх глав («Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и Обсуждение»), заключения и списка литературы. Основное содержание, изложенное на 138 страницах, содержит 3 таблицы. Список литературы содержит 99 источников, из них 89 на иностранных языках.

### **Глава 1. Обзор литературы**

В данной главе приведена общая характеристика центрохелидных солнечников и обобщена известная информация об особенностях строения клетки, о покровных структурах представителей этой группы протистов и взглядах на эволюцию этих структур. В кратком систематическом обзоре рассмотрены основные таксоны, выделяемые в составе группы на настоящий момент, по каждой группе приведены иллюстративный материал, краткое описание ее особенностей и систематические диагнозы.

### **Глава 2. Материал и методы**

Материалом для исследования послужили пробы, отобранные автором в ходе его многолетней работы на внутренних озёрах Валаамского архипелага и других водоёмах Северо-запада России (40 проб), а также пробы из различных пресноводных местообитаний Дании (13 проб), Швейцарии (15 проб), Крайнего севера России (1 проба), Дальнего Востока России (15 проб), а также Южной Африки (13 проб), имевшиеся в распоряжении группы протистологии кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ.

Пробы высевали в чашки Петри и инкубировали в лаборатории, получая накопительные культуры. Затем солнечников, которые представляли интерес с точки зрения задач исследования, выделяли в клональную культуру. Всего в ходе работы было посеяно 97 проб, из которых в 30 были найдены солнечники. Из них 19 штаммов были выделены в чистую клональную культуру, два из них на настоящий момент депонированы в Коллекции Культур Водорослей и Простейших (CCAP, Institute of Freshwater Ecology, England). Ещё 5 штаммов были исследованы в накопительных культурах. При длительном хранении штаммы поддерживали при температуре +4 °С, закрыв чашки лабораторной лентой Parafilm M (Sigma-Aldrich).

Для наблюдения и фотографирования солнечников в чашках Петри использовали инвертированные микроскопы Nikon Eclipse TS100 и Leica DMI 3000B, снабжённые фазово-

контрастной оптикой и оснащенные цифровой камерой Nikon DS-Fi1. Для изучения на световом уровне или в сканирующем электронном микроскопе клетки высушивали на покровных стёклах (Zeiss Supra 40 VP, Zeiss Merlin и Tescan Mira3 LMU) или на медных блендах с формваровой подложкой для изучения в просвечивающем электронном микроскопе (Jeol JEM-1400 и Jeol JEM-2100HC). Чтобы избежать сигнала от кремния, содержащегося в стекле для энергодисперсионного рентгеновского анализа (Oxford Instruments INCAx) клетки высушивали на канцелярском скотче.

Геномная ДНК была изолирована из клеток с помощью гуанидин-изотиоцианатного метода (Maniatis et al. 1983). Ген малой субъединицы рРНК амплифицировали с использованием пары концевых праймеров Thx25F — Helio1979R, ампликоны подвергали прямому секвенированию или клонировали при помощи вектора pTZ57R/T (Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit#K1213, #K1214) в бактериях *Escherichia coli* (штамм JM107).

Ампликоны секвенировали используя секвенаторы ABI Prism 310 или ABI Prism 3500 xl (Applied Biosystems, USA); полученные последовательности выравнивали вручную при помощи программы SeaView (Galtier, Gouy, 1996). Реконструкцию филогенетических деревьев на основе набора выровненных последовательностей проводили при помощи программ PhyML (Guindon, Gascuel, 2003) и MrBayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001).

### Глава 3. Результаты и обсуждение

#### Изучение цистных чешуек *Raineriophrys erinaceoides* и *Raphidiophrys heterophryoidea*.

В ходе нашего исследования на примере двух видов *Raineriophrys erinaceoides* и *Raphidiophrys heterophryoidea* удалось показать, что в пределах одной клональной культуры солнечники могут иметь различные, существенно отличающиеся наборы чешуек. Это связано с тем, что у эксцистировавшихся особей в покровах некоторое время продолжают персистировать цистные чешуйки.

Эксцистировавшихся индивидуумов (рис. 1B) можно было наблюдать в более старых культурах и, помимо цистных чешуек, присутствующих наряду с обычными чешуйками трофической стадии (рис. 1A), каких-либо отличий от прочих трофозоитов выявлено не было. Были получены субклоны эксцистировавшихся индивидуумов *R. heterophryoidea*, и клетки в культурах имели только чешуйки трофической стадии.

Идентификация и разделение видов у центрохелид ведётся на основании морфологии чешуек. Некоторые авторы определяют солнечников и/или описывают виды на основании отдельных чешуек, найденных в пробах (Wujek, 2003; Esteban et al., 2012). Находка цистой чешуйки, имеющей совершенно необычную морфологию, заставит в такой ситуации думать, что мы имеем дело с новым видом и не позволит корректно идентифицировать организм. Именно поэтому точное описание всех типов чешуек, включая цистные чрезвычайно

желательно для каждого вида центрохелидных солнечников. Этот пример показывает, что чешуйки трофических стадий в некоторых случаях могут не являться единственным и достаточным признаком для описания и идентификации видов.

**Сравнение ко-специфичных штаммов из удалённых местообитаний.** Сравнение ко-специфичных штаммов из разных местообитаний было проведено на примере двух видов: *Acanthocystis nichollsi* и *Acanthocystis takahashii*. В случае *A. nichollsi* были изучены 4 штамма – из оз. Игуменское – Валаамский архипелаг, Северо-запад России; из реки Лягэдей-Яха – Ямало-Ненецкий а. о., Крайний север России; из оз. Гурре – Дания и из горного ручья в

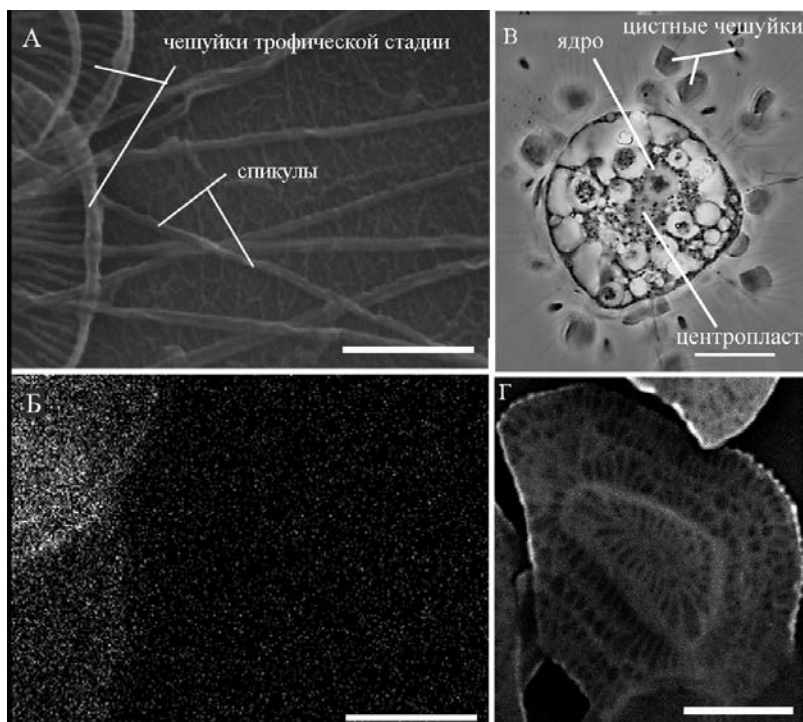


Рис. 1. *Raphidiophrys heterophryyoidea* Zlatogursky, 2012, оз. Никоновское, Валаамский архипелаг. А. Высушенный препарат чешуек трофической стадии. СЭМ. Б. Энергодисперсионный рентгеновский анализ. Карта распределения кремния. Белые точки отвечают пикам кремния. В. Эксцистировавшийся организм под покровным стеклом, Г. Цистная чешуйка. СЭМ. Масштабная черта: А., Б. – 1 мкм, В. – 10 мкм, Г – 2 мкм.

Восточно-Капской провинции ЮАР. Также, нами были изучены 2 штамма *Acanthocystis takahashii* из оз. Лещовое – Валаамский архипелаг, Северо-запад России и р. Амур - Дальний Восток России. Морфологические и морфометрические характеристики как трофозоитов, так и чешуек изученных штаммов совпадали с параметрами в оригинальных описаниях (Nicholls, 1983; Dürschmidt, 1987), что говорит о ко-специфичности изученных штаммов в рамках существующей морфологической концепции вида у центрохелидных солнечников.

Молекулярно-

филогенетический анализ подтвердил близкое родство ко-специфичных штаммов из различных местообитаний (рис. 2). Как *Acanthocystis nichollsi*, так и *Acanthocystis takahashii* сформировали на дереве хорошо поддержанные клады. В кладу *Acanthocystis nichollsi* также попал сиквенс AY749632, идентифицированный как *Acanthocystis nichollsi* из Великобритании (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007). К кладе *Acanthocystis takahashii* сестринское положение занимает не идентифицированный сиквенс AY749628 из Новой Зеландии, что может говорить о том, что это ещё один, третий сиквенс *Acanthocystis takahashii*. Сравнение молекулярных данных по штаммам ко-специфичным согласно морфологической концепции показала, что оба метода



выявляют одни и те же совокупности. Таким образом если сравнить между собой именно чешуйки трофической стадии, то описание и идентификация видов может осуществляться на основе морфологии покровных структур.

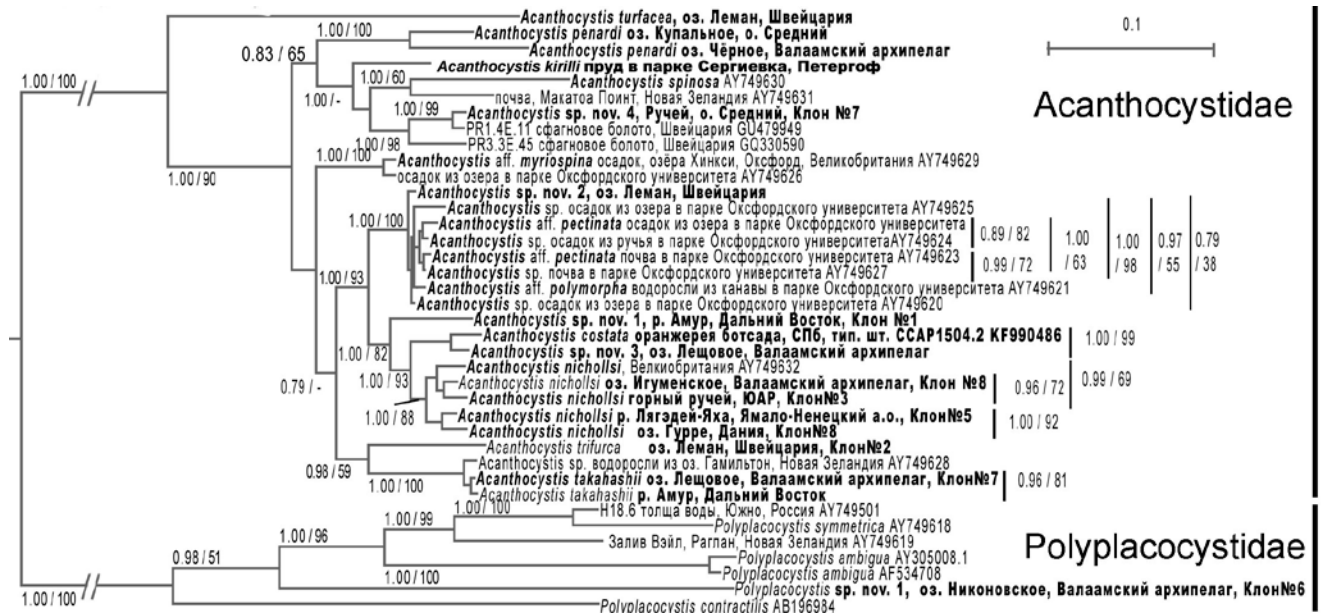


Рис. 2. Фрагмент байесовского дерева на основе сиквенсов гена 18S рРНК (GTR-модель, 1569 позиций) для 121 таксона центрохелидных солнечников, а также 32 близких внешних групп. Новые сиквенсы выделены жирным шрифтом. Поддержка: слева – постериорная вероятность, справа – значение бутстрапа при анализе методом максимального правдоподобия, если клада отсутствовала при этом анализе, справа стоит знак «-». Молекулярные клоны обозначены пометкой «Клон» с порядковым номером, остальные сиквенсы были получены прямым секвенированием ПЦР-продукта. Полное дерево представлено в тексте работы.

**Сравнение симбионт-содержащих штаммов солнечников с бесцветными (*Acanthocystis penardi* Wailes, 1925; *Acanthocystis turfacea* Carter, 1863).** Представители двух видов — *Acanthocystis turfacea* и *Acanthocystis penardi* являются одними из широко распространённых солнечников. Благодаря своим крупным размерам они часто отмечаются исследователями (Nicholls, 1983). В оригинальных описаниях обоих видов и последующих находках часто указывается наличие в цитоплазме солнечников симбиотических хлорелл (Carter, 1863; Wailes, 1925; Siemensma, 1991). Однако были отмечены и находки бесцветных солнечников, которые имели сходную морфологию чешуек, но меньшие размеры (Rainer, 1968).

По нашим данным, симбионтсодержащие клетки *Acanthocystis penardi* имеют больший диаметр клетки и более крупные чешуйки и чешуек. Аналогичная закономерность выявляется при сравнении наших данных по бесцветным *Acanthocystis turfacea* с литературными по симбионтсодержащим *Acanthocystis turfacea* (Rainer, 1968). Данный результат может говорить либо о том, что формы с симбионтами представляют собой самостоятельные виды (подобно *Paramecium bursaria* среди инфузорий) либо о том, что захват хлорелл у этих двух видов

происходит факультативно и вызывает увеличение как диаметра клетки, так и размеров покровных структур.

**Статус *Acanthocystis trifurca* Nicholls, 1983 и *A. myriospina* Penard, 1890.** В ходе работы был реизолирован и изучен солнечник *Acanthocystis trifurca*. Синонимизация этого названия с названием *A. myriospina* Penard, 1890, сделанная Дюршмит (Dürschmidt, 1985) не кажется нам обоснованной. При сравнении данных Николса и оригинального описания Пенара налицо явные отличия солнечныхников по диаметру клетки, а также по длине радиальных чешуек. Наш вывод подтверждается результатами молекулярно-филогенетического анализа. На молекулярных деревьях *A. trifurca* группируется с кладой *A. takahashii*, в то время как *Acanthocystis* aff. *myriospina* AY749629 в другой части дерева образует кладу с не идентифицированным сиквенсом из озера в парке Оксфордского университета (Великобритания) (AY749626) (Рис. 2).

**Независимое возникновение солнечныхников только с тангентальными кремниевыми чешуйками.** Семейство Raphidiophryidae Febvre-Chevalier, Febvre, 1984, согласно последней системе (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007) объединяет роды *Polyplacocystis* и *Raphidiophrys*, обладающие только тангентальными кремниевыми чешуйками при полном отсутствии радиальных. На основании молекулярно-филогенетических данных семейство Raphidiophryidae было отнесено к отряду Acanthocystida. Следует особо отметить, что такие базовые модусы покровных структур как спикулы или двойной слой кремниевых чешуек (радиальные и тангентальные) были обнаружены в обоих отрядах центрохелид – Pterocystida и Acanthocystida и только солнечники с тангентальными кремниевыми чешуйками, но без радиальных – семейство Raphidiophryidae, как считалось, возникали в эволюции только один раз (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007; Cavalier-Smith, Chao, 2012). Тем не менее, молекулярные данные по типовому роду семейства – *Raphidiophrys* до настоящего времени отсутствовали. Были получены только сиквенсы трёх видов из рода *Polyplacocystis*.

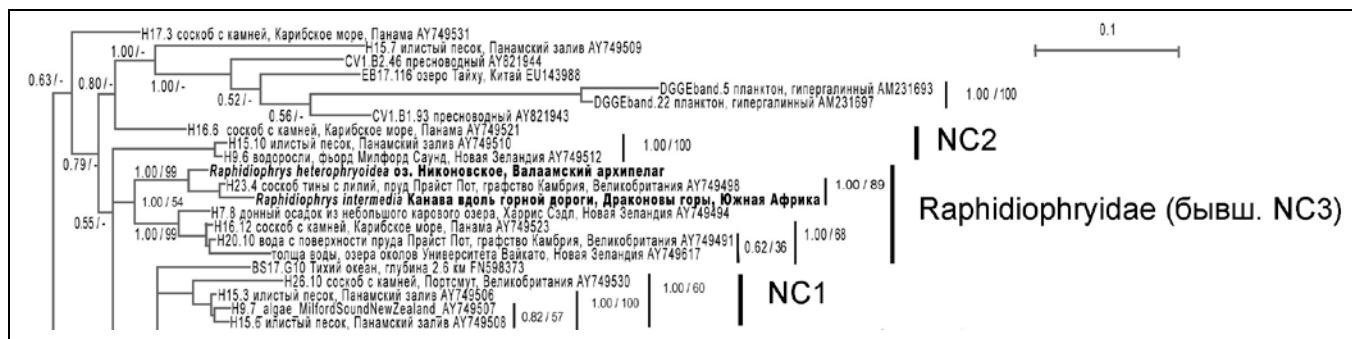


Рис. 3. Фрагмент байесовского дерева на основе сиквенсов гена 18S рРНК (GTR-модель, 1569 позиций). Параметры, обозначения – см. рис. 2. Полное дерево представлено в тексте работы.

Мы секвенировали ген 18S рРНК штамма, который по совокупности морфологических и морфометрических данных был идентифицирован как *Raphidiophrys intermedia* Penard, 1904 и обладает только тангентальными кремниевыми чешуйками. Этот вид занял положение в кладе, представленной исключительно не идентифицированными сиквенсами, которая условно обозначалась предшествующими исследователями как NC3 (рис. 3). Из топологии дерева следует, что данный модус покровных образований — тангентальные кремниевые чешуйки, при отсутствии радиальных возник в двух отрядах центрохелид совершенно независимо и не является уникальным, как это было показано ранее и для других типов покровных структур (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007).

По нашему мнению, название Raphidiophryidae следует сохранить за кладой NC3, которая включает типовой род семейства. В основном она представлена сиквенсами, полученными из тотальной ДНК, изолированной из природных местообитаний. Пока семейство имеет в своём составе только один систематически описанный род, однако учитывая большое число сиквенсов принадлежащих не идентифицированным солнечникам, можно ожидать, что в будущем его объем существенно увеличится. Для клады, которая ранее обозначалась, как Raphidiophryidae, мы предлагаем новое название – Polyplacocystidae.

**Raphidiophrys heterophryoidea Zlatogursky, 2012.** Согласно результатам, изложенным в предыдущем подразделе, род *Raphidiophrys*, обладающий только тангентальными кремниевыми чешуйками на филогенетических схемах оказывается глубоко внутри отряда Pterocystida, и его ближайшими родственниками являются представители рода *Choanocystis*, имеющие наряду с тангентальными и радиальные чешуйки. В связи с этим особый интерес представляет один из описанных нами видов рода *Raphidiophrys* – *R. heterophryoidea* Zlatogursky, 2012, который демонстрирует переходный тип строения покровных структур между двумя этими родами. Помимо тангентальных кремниевых чешуек в состав его покровов входят также радиальные элементы веретеновидной формы (рис. 1А). С помощью энергодисперсионного рентгеновского анализа мы показали, что они не содержат кремния и представляют собой спикулы (рис. 1Б). Таким образом, *Raphidiophrys heterophryoidea* демонстрирует первый известный случай сочетания кремниевых чешуек и спикул у одного организма. При этом данный вариант строения можно рассматривать как переходный между более примитивными представителями только с тангентальными кремниевыми чешуйками (другие виды *Raphidiophrys*) и более продвинутыми *Choanocystis* имеющими как тангентальные, так и радиальные кремниевые чешуйки. Однако нельзя исключать и иного сценария, при котором мы наблюдаем пример вторичной утраты минерализации, произошедшей лишь частично, в отношении радиальных элементов. У других видов рода *Raphidiophrys*, согласно этой интерпретации, радиальные элементы исчезли полностью, в то время как тангентальные элементы в пределах этой ветви

всегда кремнифицируются и никогда не подвергаются какой-либо редукции. При любом из двух сценариев, наличие минерализации тангентальных элементов и отсутствие её у радиальных элементов говорит о том, что контроль над развитием двух этих компонентов покровных структур, хотя бы отчасти, осуществляется и может модифицироваться независимо.

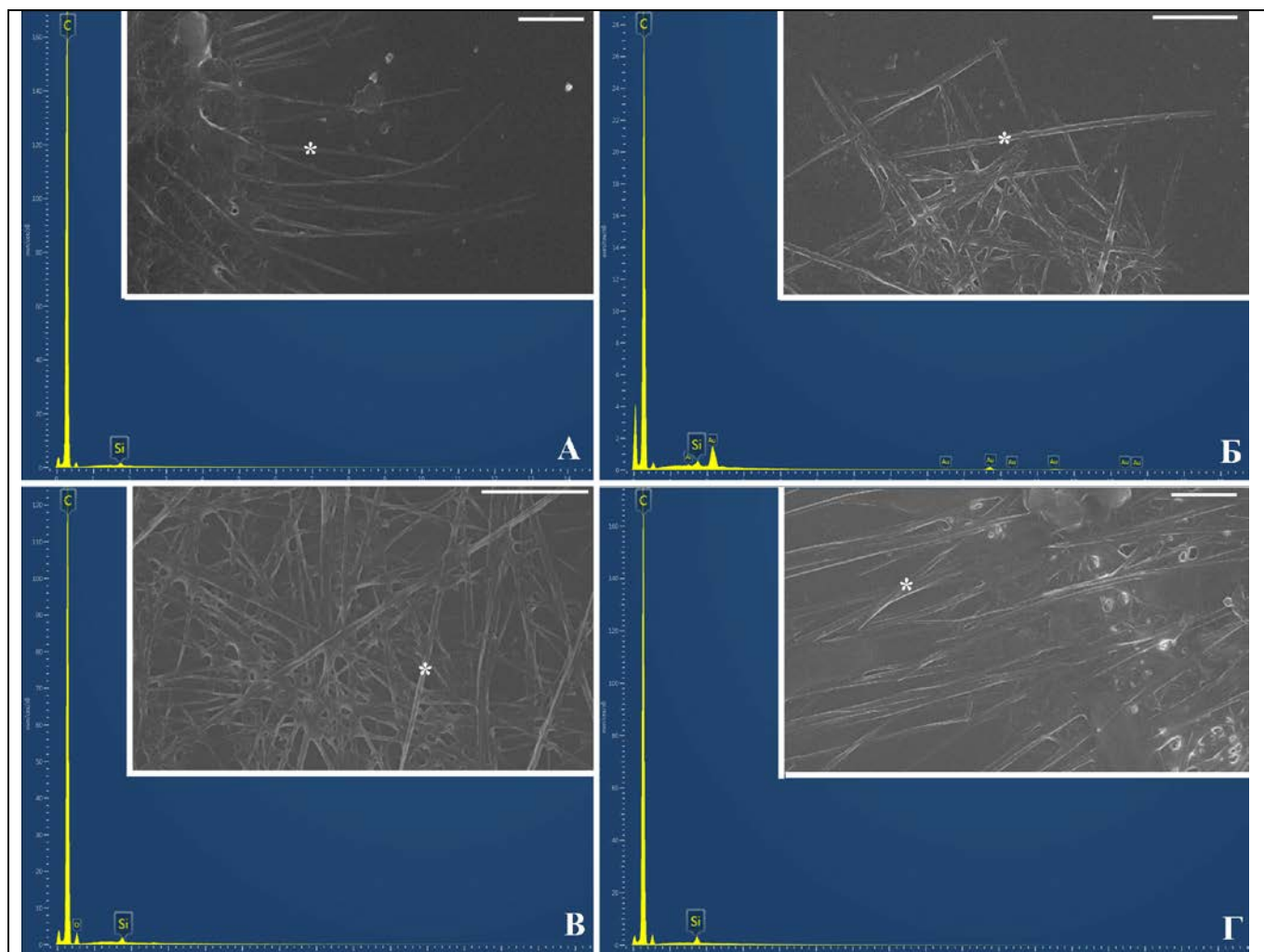


Рис. 4. Энергодисперсионный рентгеновский анализ высушенных препаратов спикул. На врезке – СЭМ, положение зонда обозначено символом «\*». А. *Acanthocystis* sp. nov. 4. Б. *Acanthocystis* sp. nov. 2. В. *Polyplacocystis* sp. nov. 1. Г. *Acanthocystis* sp. nov. 3. Масштабная черта: 1 мкм.

**Утрата кремнификации чешуек в пределах родов *Acanthocystis* и *Polyplacocystis*.** Три исследованных штамма изначально были идентифицированы нами как представители рода *Acanthocystis* в силу характерной подвижности и общих очертаний клетки. Дальнейшее их изучение показало отсутствие характерных для *Acanthocystis* покровных структур – кремниевых чешуек и наличие спикул.

Согласно последнему варианту системы (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007) такие солнечники должны быть отнесены к одному из двух семейств: Marophryidae или Heterophryidae, различить которые можно только с помощью молекулярных методов. Однако все три упомянутых штамма на филогенетическом древе оказались глубоко внутри рода

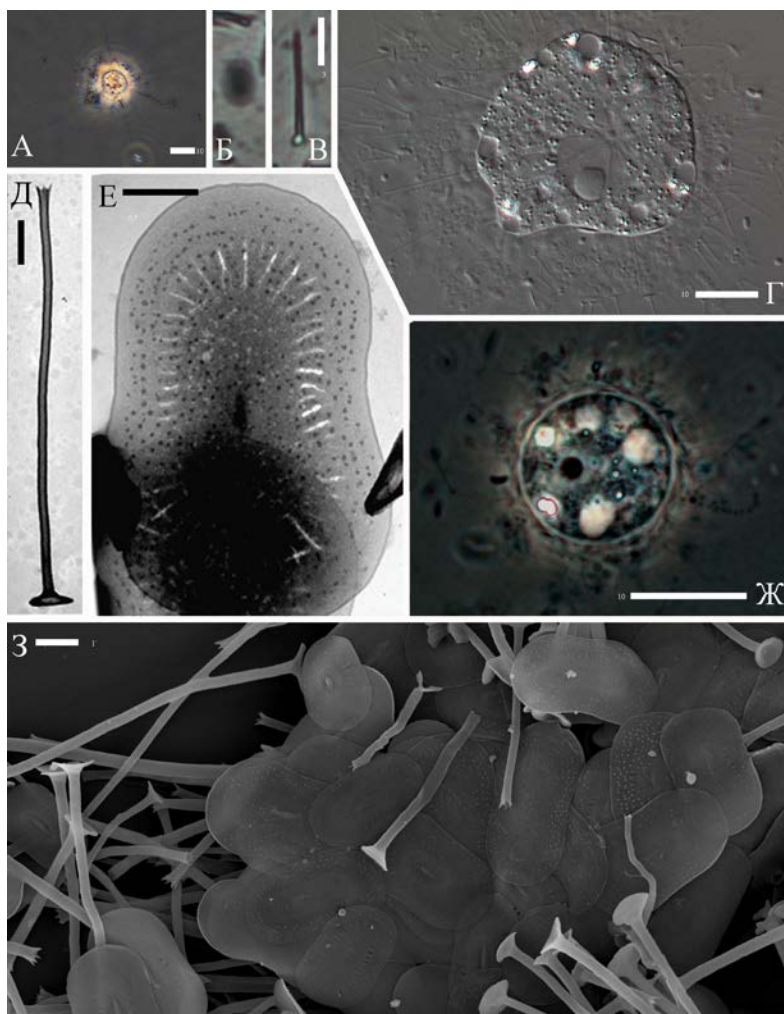


Рис. 5. *Acanthocystis costata* Zlatogursky, 2014, оранжерея ботанического сада, СПб. А. Общий вид клетки. Фазовый контраст. Б. Пластинчатая чешуйка. Фазовый контраст. В. Радиальная чешуйка. Фазовый контраст. Г. Клетка, придавленная покровным стеклом. Контраст Номарского. Д. Радиальная чешуйка. ТЭМ. Е. Пластинчатая чешуйка. ТЭМ. Ж. Клетка, придавленная покровным стеклом. Фазовый контраст. З. Радиальные и пластинчатые чешуйки. СЭМ. Масштабная черта: А. 10 мкм; Б., В. – 3 мкм; Г., Ж. – 10 мкм; Д., Е. – 0,5 мкм, З. – 1 мкм.

*Polyplacocystis*, а наличие кремниевых чешуек не является облигатным признаком для этих родов.

Согласно предположению Кавалье-Смита и фон дер Хейден (Cavalier-Smith, von der Heyden, 2007), утрата минерализации радиальных чешуек приводит к образованию спикул. Это событие, судя по всему, происходит независимо и многократно в результате необратимого сбоя на каком-то этапе минерализации органической матрицы, в результате чего остаётся только органический «остов» радиальной чешуйки – спикула. Таким образом, данное эволюционное преобразование является сравнительно легко воспроизводимым и может осуществляться «в один шаг» за счёт мутации, вызывающей прекращение минерализации. Косвенно эту точку

*Acanthocystis* (рис. 2). При этом они не составляли единую ветвь, а группировались с различными видами *Acanthocystis*. Штамм из оз. Лещовое (Валаамский архипелаг) образовал кладу с *A. costata* из бассейна в ботаническом саду СПбГУ; женеvский штамм из оз. Леман – с группой не идентифицированных сиквенсов из озера в Оксфорде (AY749620-AY749625; AY749627), а штамм из озера на о. Среднем (Белое море) – с не идентифицированным сиквенсом из сфагнового болота в Швейцарии (GU479949). Ещё один изученный нами штамм солнечных, имеющих спикулы, занял положение внутри клады рода *Polyplacocystis*. Данная топология дерева свидетельствует о том, что три штамма солнечных со спикулами представляют новые виды рода *Acanthocystis* и ещё один штамм – новый вид рода

зрения подтверждают и данные энергодисперсионного рентгеновского анализа (рис. 4). При исследовании спикул всех четырёх штаммов были обнаружены очень маленькие следовые количества кремния. Таким образом, несмотря на то, что «чешуйки» не имеют сложной видоспецифичной формы, остаточные процессы кремнификации всё же идут и могут быть зафиксированы.

Полученный нами результат – сочетание в пределах одного рода форм с контрастно отличающейся морфологией чешуек демонстрирует, что роды солнечников не всегда надёжно разделяются на основании морфологии покровных структур.

**Диагнозы таксонов.** В работе приводятся описания 12 новых видов и одного нового семейства Polyplacocystidae, пересмотрен диагноз семейства Raphidiophryidae. В качестве примера мы приводим здесь описание одного нового вида *Acanthocystis costata* Zlatogursky, 2014 (рис. 5).

**Описание:** Клетки солнечников имели от 5,8 до 12,0 мкм (в среднем – 9,5) в диаметре. Длина радиальных чешуек 2,1 – 9,5 (сред. 5,1) мкм. Наряду с прямыми, встречаются изогнутые чешуйки. Радиальные чешуйки с четырьмя, пятью или шестью зубцами. Пластинчатые чешуйки с вогнутыми или иногда с параллельными краями и закруглёнными концами. Длина пластинчатых чешуек 1,3 – 3,7 (сред. 2,6) мкм, ширина 0,9 – 1,9 (сред. 1,4) мкм. Периферия чешуйки с утолщённым краем, имеется аксиальное утолщение и около 50 радиальных рёбрышек. На одной из сторон чешуйки видны многочисленные мелкие гранулы. Клетки активно перемещаются по дну культуральной чашки или флотируют в толще среды.

**Дифференциальный диагноз:** Пластинчатые чешуйки с радиальными рёбрышками также описаны у *A. trifurca* и *A. nichollsi*. У *A. trifurca* рёбрышки наблюдал только Ройджакерс (Siemensma, 1991), и были опубликованы только штриховые рисунки чешуек. При этом количество рёбрышек на рисунке – около 19, в то время как у нового вида оно составляло примерно 50. Присутствие двух разных типов чешуек у *A. trifurca*, скорее всего, говорит о том, что под этим названием описывались разные виды. Так или иначе, новый вид также отличается от *A. trifurca* по строению радиальных чешуек, которые у последнего несут 3 зубца, в то время как в нашем штамме число зубцов варьирует от 4 до 6, но никогда не равно 3. У *A. nichollsi* число рёбрышек (около 50 на чешуйку) совпадает с нашим штаммом. Размеры чешуек также сравнимы, хотя и не совпадают в точности: 1,4 – 2,2 x 2,3 – 3,8 (*A. nichollsi* по Siemensma, 1991). Чешуйки *A. nichollsi* отличаются отсутствием гранул. Морфология радиальных чешуек *A. nichollsi* совершенно иная: короткие радиальные чешуйки имеют длинные выросты на вершине, которые соединяются тонкими мембраноподобными пластинками (Nicholls, 1983). Ничего подобного на радиальных чешуйках *A. costata* мы не наблюдали. *A. mylnikovi* напоминает новый вид тем, что имеет радиальные чешуйки с четырьмя, пятью или шестью

зубцами (хотя для этого вида также отмечены чешуйки с двумя и тремя зубцами). Тем не менее, радиальные чешуйки *A. costata* гораздо короче: 2,8 – 11,3 мкм, в отличие от 5 – 17 мкм у *A. mylnikovi* (Leonov, 2010) и пластинчатые чешуйки *A. mylnikovi* не имеют рёбрышек. Также сходные радиальные чешуйки с 5-8 зубцами имеются у *A. dresscheri* Siemensma et Roijackers, 1988. Однако этот вид хорошо отличается по размерам, а также по морфологии пластинчатых чешуек, которые не имеют радиальных рёбрышек и покрыты мелкими гранулами.

### **Основные полученные результаты**

1. Получены 30 штаммов солнечников, 19 из них выделены в чистую клональную культуру. Всего в работе изучено 19 видов, относённых нами к 5 родам. Все штаммы исследованы методами световой и электронной микроскопии. Для 21 штамма были получены сиквенсы гена 18S рРНК. Описано 12 новых для науки видов.

2. Изучение клональных культур показало, что морфология чешуек в пределах клона стабильна, однако после эксцистирования в покровах солнечника появляются дополнительные типы чешуек (цистные чешуйки), существенно отличающиеся по морфологии от чешуек трофической стадии.

3. Изученные нами солнечники только с тангентальными чешуйками (*Raphidiophrys intermedia*), а также с тангентальными чешуйками и спикулами (*R. heterophryoidea*) по результатам молекулярно-филогенетического анализа занимают положение в отряде Pterocystida. Три изученных штамма солнечников со спикулами по результатам молекулярно-филогенетического анализа оказываются внутри рода *Acanthocystis* и один внутри рода *Polyplacocystis*.

4. Филогенетический анализ показывает, что в состав клад, соответствующих родам *Acanthocystis* и *Polyplacocystis*, входят виды с радикально отличающимися клеточными покровами.

### **Выводы**

1. Биоразнообразие группы по-прежнему слабо изучено (40% от числа изученных штаммов оказались новыми видами).

2. Необходимо учитывать признак строения цистных чешуек при описании и последующей идентификации солнечников.

3. Солнечники, обладающие только тангентальными кремниевыми чешуйками, возникают в эволюции центрохелид как минимум дважды. Солнечники, в состав покрова которых входят спикулы, возникают в эволюции центрохелид многократно и независимо.

4. Взгляды на использование типов строения скелетных элементов при выделении родов солнечников должны быть существенно пересмотрены, тип строения покровных структур не является для этой цели универсальным критерием.

## Заключение

Покровные структуры, будучи важным признаком, не могут быть единственным основанием для описания и идентификации видов, а также для построения системы центрохелидных солнечников. Следует комбинировать данные по морфологии чешуек с результатами молекулярно-филогенетического анализа, а также по возможности выделять солнечников в чистые клональные культуры. Весьма важно изучать не только морфологию чешуек трофической стадии, но и цистных чешуек. Хотя для получения полной картины эволюции покровных структур необходимо получить молекулярные данные по многим недостающим представителям, уже сейчас ясно, что в двух отрядах солнечников – *Acanthocystida* и *Pterocystida* эволюция может идти параллельными путями и, как минимум в некоторых случаях она ведёт к вторичному упрощению покровных образований.

## Список публикаций по теме диссертации

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Zlatogursky V. V.** Three new freshwater species of centrohelid heliozoans: *Acanthocystis crescenta* sp. nov., *A. kirilli* sp. nov., and *Choanocystis minima* sp. nov. / **V. V. Zlatogursky** // European Journal of Protistology. — 2010. — Vol. 46. Is. 3. P. 159—163.
2. **Zlatogursky V. V.** *Raphidiophrys heterophryoidea* sp. nov. (Centrohelida: Raphidiophryidae), the first heliozoan species with a combination of siliceous and organic skeletal elements. / **V. V. Zlatogursky** // European Journal of Protistology. — 2012. — Vol. 48. Is. 1. P. 9—16.
3. **Zlatogursky V. V.** Puzzle-like cyst wall in centrohelid heliozoans *Raphidiophrys heterophryoidea* and *Raineriophrys erinaceoides* / **V. V. Zlatogursky** // Acta Protozoologica. — 2013. — Vol. 52. Is. 4. P. 229—236.

### Публикации в других изданиях

4. **Златогурский В.В.** Солнечники. / **В. В. Златогурский** // Протисты: руководство по зоологии. / под ред. О. Н. Пугачёва, А. Ф. Алимова, М. В. Крылова, Л. Н. Серавина, С. А. Карпова. — СПб.; М., Товарищество научных изданий КМК. 2011. Ч. 3. — С. 205—269.
5. **Zlatogursky V.V.** Biodiversity, taxonomy and evolution of «Heliozoa» / **V. V. Zlatogursky** // Materials of VI European Congress of Protistology, Berlin, 25-29 July 2011.
6. **Zlatogursky V.V.** Different types of locomotive activity in heliozoans / **V. V. Zlatogursky** // Materials of «Protist 2012» conference, Oslo, 29 July – 3 August 2012.
7. **Zlatogursky V.V.** *Raphidiophrys heterophryoidea* – a no longer missing link in the evolution of centrohelid heliozoan / **V. V. Zlatogursky** // Materials of XIV International Congress of Protistology, Vancouver, 28 July – 2 August 2013.