

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
НА ДИССЕРТАЦИЮ В. В. ЗЛАТОГУРСКОГО
"Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных
солнечников (Protista: Centrohelida) "**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.04 – Зоология

Квалификационная работа В. В. Златогурского "Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных солнечных (Protista: Centrohelida)" задумана как комплексное сравнительно-морфологическое и филогенетическое исследование слабо изученной группы эукариотных микроорганизмов – центрохелид (Centrohelida). При этом диссертант фокусирует свое исследование на наиболее информативных для целей систематики и филогении центрохелид покровных структурах их клеток. Центрохелиды широко представлены в водной биоте различных типов водоемов, как пресноводных, так и обладающих различной степенью солености. При этом, центрохелиды входят в состав как бентосных, так и планктонных сообществ. Численность этих организмов в природных условиях часто может достигать значительных величин, а биомасса составлять до 1/3 биомассы всех эукариотных микроорганизмов конкретного водоема. Известно, что центрохелиды играют существенную роль в пищевых цепях водоемов, являясь важным элементом т.н. «микробальной петли». Очевидно, поэтому, что знание этой группы чрезвычайно важно при решении многих вопросов современной биологии, в частности, при анализе состояния и мониторинге водных экосистем, при изучении биоразнообразия и т.д. Между тем, несмотря на предполагаемую «комфортность» изучения центрохелид (крупные размеры, богатую морфологию, способность к культивированию *in vitro*) они до сих пор остаются в тени. После развала полифилетического таксона Heliozoa (солнечников) бывшие его представители в большинстве обрели свое место в 3 разных филогенетических мегагруппировках эукариот, тогда как центрохелиды оказались в положении таксона *incertae sedis*. Немногочисленные филогенетические исследования смогли подорвать доверие к прежней системе центрохелид, но не создали новую.

Исходя из вышеизложенного я могу заключить, что тема диссертационной работы В. В. Златогурского напрямую связана с получением новых, оригинальных данных в отношении слабоизученной группы эукариотных микроорганизмов – центрохелид, имеющих важное практическое и теоретическое значение для развития современных биологических знаний. Этот вывод содержит все основные признаки, определяющие диссертационную работу согласно п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней».

Диссертационная работа В. В. Златогурского представлена в одном томе на 138 страницах машинописного текста, состоит из «Введения», 3 глав, раздела «Основные результаты», «Выводов» и «Заключения», содержит 41 иллюстрацию и 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 99 источников, из них 89 – иностранных. В целом структура диссертации близка к «классической» схеме написания данного типа квалификационных работ. Мне показались неудачными топология и содержание двух очень маленьких, но самостоятельных разделов этой диссертации: «Основные результаты» и «Заключение». Первый из них предваряет «Выводы», а второй следует сразу за ними. Объем каждого из разделов меньше 1 страницы. С одной стороны они в значительной степени повторяют друг друга, а кроме того, вкуче, представляют расширенный вариант «Выводов». Мне представляется, что если диссертант испытывал необходимость в некоем подведении итогов результата своей работы, для перехода от ее содержательной части к «Выводам», то, в данном случае, достаточно было ограничиться расширенным «Заключением», поместив его перед «Выводами».

Во «Введении» (стр. 4 – 10) диссертантом кратко рассмотрена история формирования взглядов на систематику и филогению центрохелид, сформулированы основные проблемы, связанные с их слабой изученностью и определены перспективные направления новых исследований. Введение содержит все основные разделы, которые рекомендованы для включения в данный тип квалификационных работ. Все они написаны четко и в полной мере характеризуют диссертационную работу В. В. Златогурского. Остановлюсь на некоторых из них. Цель исследования сформулирована диссертантом предельно ясно: «изучить разнообразие и пути эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников». Так же конкретны и задачи, которые ставит перед собой соискатель, их необходимость и достаточность для достижения поставленной цели – не вызывают сомнений. В. В. Златогурский выносит на защиту 3 основных положения своей работы, которые полностью соответствуют цели его исследования и логично связаны с комплексом решаемых в нем задач. Как я уже писал выше, актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы В. В. Златогурского не вызывают у меня сомнений. Основные результаты исследования были представлены на трех крупных международных конференциях, неоднократно докладывались на научных семинарах кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ. По теме диссертации опубликовано 7 работ. Из них 3 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК и входящих в базы данных научных публикаций Web of science. Я особо хочу отметить здесь еще одну публикацию В. В. Златогурского, которая, по превратностям судьбы и ВАК РФ, не входит в указанный список. Это глава «Солнечники» в трехтомнике «Руководство по зоологии. Протисты», изданном Зоологическим институтом РАН. То, что научный редактор третьего тома С. А. Карпов доверил в 2010 году ее написание будущему аспиранту кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ В. В. Златогурскому, говорит о многом.

Глава 1. Обзор литературы (стр. 10 – 34). Глава в целом написана очень хорошо. Диссертантом проделан большой труд по разностороннему анализу материалов из более чем 90 источников. Временной диапазон использованных работ охватывает период с конца 19 в. до 2013 г. Очень удобным является распределение всего массива данных по 4 подглавкам: 1.1. Общая характеристика центрохелидных солнечников (стр. 10); 1.2. Покровные структуры (стр. 16); 1.3. Эволюция покровных образований (стр. 22); 1.4. Систематический обзор центрохелидных солнечников (стр. 26), в каждой из которых обсуждаются конкретные проблемы. Обзор литературы, написанный В. В. Златогурским, в полной мере выполняет свои функции в данной работе, создавая у читателя ясное представление о степени изученности как группы в целом, так и конкретных вопросов связанных с современными представлениями об организации и эволюции покровных структур и их роли в систематике центрохелид. В этой главе диссертант демонстрирует свободное владение хорошим научным языком. Текст не перегружен специальными терминами, жаргонизмы и стандартные клише практически отсутствуют. Здесь я выскажу ряд пожеланий, которые касаются всего текста диссертации, дабы не возвращаться к ним при анализе последующих разделов. Хотя, технически оформление работы выполнено на хорошем уровне, оно, все же – не безупречно. Наличие опечаток, повторы текста, случайные символы, нарушения форматирования, разные шрифты - все эти огрехи присутствуют в работе В. В. Златогурского. Кроме того, мне не понравилась идея с выделением отдельных терминов жирным шрифтом. Часто в скобках рядом с таким термином приводится его английский перевод. Я так и не разобрался какую цель преследует диссертант выделяя тот или иной термин и зачем нужен перевод. Но если я прав, и автор таким образом акцентирует внимание на тех названиях, которые по его мнению могут быть не известны читателю, то, вообще говоря, для этих целей обычно создают очень удобный раздел «словарь специальных терминов».

Глава 2. Материал и методы (стр. 34 – 47). Прочтение этой главы оставляет самое благоприятное впечатление. В ней представлены данные, дающие полное представление

об объеме использованного материала и методах исследований, выбранных диссертантом для достижения поставленных задач. Глава разбита на 5 подглавок, первая из которых 2.1 «Пробы и штаммы, использованные в работе». Здесь описаны методы культивирования центрохелид, использованные в процессе исследования, приводится подробная характеристика полученных изолятов. Из 30 полученных соискателем изолятов центрохелид, 20 штаммов, относящихся к 17 видам и 5 родам были переведены им в чистые клональные культуры, две из которых депонированы в CCAP, IFE (England). В подглавках 2.2 – 2.5 автор описывает методическую базу своего исследования. Наряду с различными методами микроскопии как световой, так и электронной, В. В. Златогурский использует метод энергодисперсионного рентгеновского анализа, достаточно редко применяемый в практике протозоологов. Молекулярно-филогенетический анализ центрохелид - один из основных рабочих инструментов, которые диссертант использует в этой работе. В. В. Златогурский демонстрирует отличное знание и владение всеми тонкостями этого метода на всех этапах - от выделения тотальной ДНК до реконструкции итоговых филогенетических деревьев. Оригинальные сиквенсы гена 18S рРНК получены диссертантом для 21 штамма центрохелид. Мне очень импонирует то, что в этой работе молекулярно-филогенетический метод использован не в качестве «паровоза», как это часто можно наблюдать в квалификационных работах, а как истинно рабочий инструмент, служащий, в том числе, для проверки исходных «морфологических» гипотез.

Достоверность полученных результатов определяется воспроизводимостью всех использованных в работе методов, а в необходимых случаях биоинформационным или статистическим анализом.

В этой главе, возможно, автору следовало бы посвятить несколько фраз компьютерным методам подготовки иллюстративного материала. Если в большинстве случаев – это дань традиции, то при включении в работу «нетрадиционных материалов» см. Рис. 14 Е на стр. 66. – это крайне желательно. К слову сказать, качество всех иллюстраций, включенных в работу, как штриховых, так и полутоновых – безупречно.

Резюмируя комментарии к главе «Материал и методы» хочу особо подчеркнуть, что методические подходы использованные В. В. Златогурским характеризуют его как универсального и высоко профессионального экспериментатора с большим творческим потенциалом.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» (стр. 47 – 119). Глава разбита на 8 подглавок, их предваряет краткое введение, которое еще раз очерчивает круг и специфику задач, решаемых диссертантом.

В разделе 3.1 «Изучение цистных чешуек *Raineriophrys erinaceoides* и *Raphidiophrys heterophryoidea*» диссертант на примере двух видов центрохелид убедительно демонстрирует, что даже в пределах одной клональной культуры эти организмы могут иметь различные, существенно отличающиеся наборы чешуек. Это очень важный вывод, учитывая, что морфология покровных элементов зачастую остается главным или даже единственным признаком при идентификации видов центрохелид. Неудачным следует признать использование автором термина «трофические чешуйки» в качестве синонима термина «чешуйки трофических стадий» (см. например, стр. 51 или рис. 12, 13), не хотелось бы, чтобы эта «новация» вышла за пределы данной работы.

3.2 «Сравнение ко-специфичных штаммов из удалённых местообитаний» - очень интересный и важный раздел работы. Изучение внутривидового разнообразия это очень перспективное направление современных, в том числе и молекулярно-филогенетических исследований. Сравнение ко-специфичных штаммов из различных удалённых местообитаний было выполнено диссертантом на примере двух видов центрохелид: *Acanthocystis nichollsi* и *Acanthocystis takahashii*. У *A. nichollsi* было изучено 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 Восточно-Капской провинции ЮАР. Столь существенно разобценные географические

точки мест обитания, характеризующиеся полярными климатическими и экологическими параметрами – отличный выбор для решения поставленной задачи. Диссертант убедительно демонстрирует, что общая морфология и морфометрия клеток из всех 4х штаммов *A. nichollsi* если и не идентична в частностях, то вполне укладывается в допустимый размах вариаций всех исследованных признаков и делает обоснованный вывод о ко-специфичности исследованных культур. Аналогичным образом были исследованы 2 штамма *Acanthocystis takahashii* из оз. Лещовое – Валаамский архипелаг, Северо-запад России и р. Амур - Дальний Восток России. Как и в случае с *A. nichollsi* диссертант убедительно доказал что по совокупности морфологических и мофометрических параметров обе культуры центрохелид могут быть отнесены к одному виду *A. takahashii*.

Выполненный далее диссертантом молекулярно-филогенетический анализ подтвердил близкое родство тестируемых штаммов обоих видов центрохелид. Я хочу особо подчеркнуть прогностическую ценность этого исследования, что напрямую явствует из приведенного в работе примера с неидентифицированным сиквенсом AY749628 из Новой Зеландии, который занял сестринское положение к кладе штаммов *Acanthocystis takahashii* и должен быть отнесен к данному виду. Это очень полезный пример решения одной из проблем Генбанка, буквально заваленного сиквенсами неидентифицированных организмов. Согласованные результаты идентификации 2 видов центрохелид морфологическими и молекулярно-филогенетическим методами позволяют диссертанту сделать вывод о возможности описания и идентификации видов центрохелид на стадии трофозоида, лишённого цистных чешуек на основании морфологических данных. С этим можно согласиться, хотя мы знаем примеры того, как результаты исследования «третьего вида» разрушали не менее стройные гипотезы построенные на изучении двух предыдущих.

3.3 Сравнение симбионт-содержащих штаммов солнечников с бесцветными (*Acanthocystis penardi* Wailes, 1925; *Acanthocystis turfacea* Carter, 1863). Симбионт-содержащие и бесцветные штаммы известны во многих группах эукариотных микроорганизмов и вопрос их видовой идентичности постоянно встает перед специалистами. В. В. Златогурский использовал в работе представителей двух широко распространённых видов центрохелид – *Acanthocystis turfacea* и *Acanthocystis penardi*. Наиболее полно был исследован диморфизм у *Acanthocystis penardi*. Диссертант подтвердил описанную для центрохелид тенденцию к увеличению размеров клетки и покровных элементов у симбионт-содержащих организмов. Молекулярно-филогенетический анализ показал сходную топологию и близкое позиционирование обоих штаммов, не позволяющие, однако, категорично говорить об их принадлежности к одному виду. В отношении *Acanthocystis turfacea* были получены данные, еще раз подтверждающие уже упоминавшуюся закономерность, связанную с увеличением габитуса симбионт-содержащих организмов.

3.4 Статус *Acanthocystis trifurca* Nicholls, 1983 и *A. myriospina* Penard, 1890. Этот раздел содержит попытку решения задачи, связанной с общей проблемой, стоящей перед протозоологами-систематиками. Речь идет о соотношении обнаруживаемых организмов с малоинформативными первоописаниями видов, в отсутствие оригинальных типовых препаратов. Увы, до сих пор не найден универсальный рецепт как именно следует поступать в том или ином случае. По-этому, решение которое принимает В. В. Златогурский в заочной дискуссии со своими оппонентами, принимая сторону одного из них (Nicholls, 1983) вполне допустимо. Однако если самостоятельность *Acanthocystis trifurca* кажется вполне обоснованной, то вопрос с *A. myriospina* остается открытым. Во всяком случае до тех пор пока сиквенс AY749629 не будет соотнесен с полноценным морфологическим описанием.

3.5 Независимое возникновение солнечников только с тангентальными кремневыми чешуйками. Этот раздел диссертационной работы В. В. Златогурского

весьма показателен, поскольку связан с очень характерным для современной зоосистематики явлением, которое еще недавно именовалось «конфликтом морфологического и молекулярно-филогенетического подходов к систематике эукариотных организмов». Практика последних десятилетий, однако, убедила нас, что как таковые «конфликты» отсутствуют, а противоречия, возникающие при получении новых данных, суть – следствие использования в исследованиях ошибочных данных или неверная интерпретация результатов. Причем ошибки могут крыться по обе стороны «конфликта». Ревизия семейства *Raphidiophryidae*, состав которого анализирует диссертант один из примеров разрешения подобных искусственных противоречий. Целостность сем. *Raphidiophryidae* поддерживалась благодаря наличию у объединяемых в него организмов выраженного морфологического признака – тангентальных кремниевых чешуек. Этому признаку, вполне обоснованно, в рамках концепции существующей системы, придавался статус синапоморфии. Молекулярно-филогенетическое исследование 3 видов рафидиофриид, вроде бы, подтвердило валидность этого таксона. Однако диссертант обратил внимание на то, что среди 3 изученных ранее видов отсутствуют представители типового рода *Raphidiophrys*, а без этого, характеристика семейства выглядит неубедительно. В своей работе В. В. Златогурский ликвидировал этот пробел, сиквенировав ген 18S рРНК у *Raphidiophrys intermedia*. Результатом стало крушение концепции сем. *Raphidiophryidae*. Представители двух родов, входивших в его состав оказались далеко разнесены на филогенетическом древе центрохелид. Не буду перечислять последовавшие за этим таксономические трансформации, они вполне логичны и обоснованы. Однако не могу не напомнить диссертанту, что любые перемещения в системе таксона ранга рода, должны основываться на изучение его типового вида. А вот информацию о типовых видах обоих родов я здесь не нашел.

3.6 *Raphidiophrys heterophryoidea* Zlatogursky, 2012. Лапидарный стиль заглавия этого раздела в полной мере отвечает конкретике его задачи. Здесь диссертант описывает организм, который, по его мнению, демонстрирует переходное состояние покровных элементов между двумя родами *Raphidiophrys* (тангентальные кремниевые чешуйки) и *Choanocystis* (тангентальные и радиальные чешуйки). Находки переходных форм всегда интересны и украшают любую работу. В этом разделе можно также познакомиться с эффективностью применения метода энергодисперсионного рентгеновского анализа, который диссертант использует для того чтобы интерпретировать природу веретенных элементов в покровах *R. heterophryoidea*. Завершая этот раздел В. В. Златогурский делает интересный вывод о том, что контроль за формированием тангентальных и радиальных покровных структур может осуществляться в клетках центрохелид независимо. Для подкрепления этого вывода в дальнейшем, безусловно, потребуется анализ тонких механизмов внутриклеточной дифференцировки обоих элементов.

3.7 Утрата кремнификации чешуек в пределах родов *Acanthocystis* и *Polyplacocystis*. В этом разделе диссертант рассматривает еще одно направление в возможной эволюции покровных элементов центрохелид. На этот раз тестируются представители двух родов *Acanthocystis* и *Polyplacocystis*. Диссертанту удалось получить 3 штамма центрохелид из р. *Acanthocystis*, которые характеризовались отсутствием кремниевых чешуек и наличием спикул, т.е. признаков, отличающих представителей этого рода. Правильность определения их родовой принадлежности была подтверждена им молекулярно-филогенетическим методом. Диссертант обратил внимание, что все три штамма не формировали единый кластер в пределах *Acanthocystis*, а группировались с различными видами рода. Еще один, включенный в исследование штамм оказался внутри клады рода *Polyplacocystis*. Для объяснения этого феномена В. В. Златогурский, вполне обоснованно, опирается на гипотезу Кавалье-Смита и Хейден (Cavalier-Smith, Heyden, 2007), согласно которой образование спикул - органических веретенных чешуек может происходить за счёт утраты минерализации радиальных кремниевых чешуек. Отрадно, что при анализе

материала диссертант не ограничивается имеющимся в его распоряжении материалом, а привлекает данные по другим группам эукариотных микроорганизмов. Важны и обоснованы выводы, которые следует за этим: спикулы представляют собой органические матрицы радиальных чешуек, которые более не подвергаются минерализации. И: сочетание в пределах одного рода форм с контрастно отличающейся морфологией чешуек демонстрирует, что роды солнечных не всегда надёжно разделяются на основании морфологии покровных структур.

3.8 Диагнозы таксонов. Заключительный раздел главы вызвал у меня некоторое недоумение. Во-первых я не понял, и нигде не нашел информацию о том, какие именно таксоны и для чего собраны в нем. Предположу, что В. В. Златогурский перечислил здесь те из них, автором которых он является. Тогда должен напомнить диссертанту, что описание новых таксонов, равно как и иные таксономические акции недопустимы в квалификационных работах. А именно на наличие таковых указывают известные систематикам латинские термины: *emend.*, *sp. nov.*, *fam. nov.*, которыми изобилует текст данного раздела. И, уж, если браться за таксономические преобразования, то делать их надо согласно кодексу зоологической номенклатуры. По-этому, недопустимо ставить рядом с родовым названием обозначения *sp. nov.*, к тому же сопровождая их цифрами. Также как нельзя формировать новое семейство без обозначения типового рода. Я уверен, что этот раздел мог быть написан гораздо лучше, но и в его отсутствии диссертация В. В. Златогурского несколько не проиграла бы.

Выводы (стр. 120). Выводы в основном тексте диссертации и в автореферате полностью совпадают. Они логически связаны с полученными в ходе исследования результатами, объективны и достоверны. Выводы полностью отвечают главной цели исследования, содержат решения всех поставленных задач и поддерживают все положения вынесенные диссертантом на защиту.

Завершая отзыв еще раз отмечу, что основные материалы диссертации достаточно полно представлены в публикациях автора, в том числе в 3 публикациях в журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследований В. В. Златогурского были представлены на 3 международных конференциях. Автореферат достаточно полно отражает основные положения диссертационной работы и оформлен в полном соответствии с требованиями ВАК РФ.

Резюмируя все выше изложенное считаю, что диссертация В. В. Златогурского выполнена в форме научно-квалификационной работой, в полном соответствии с пунктами 9 – 14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ. Высказанные в процессе написания отзыва пожелания и замечания носят рекомендательный характер и не снижают общей очень высокой положительной оценки этой работы. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости диссертационная работа В. В. Златогурского полностью отвечает требованиям предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор В. В. Златогурский безусловно заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 – Зоология.



Главный научный сотрудник
лаборатории протозоологии
ФГБУН Зоологический институт РАН
доктор биологических наук

А.О. Фролов