

## Отзыв

официального оппонента на диссертацию Златогурского Василия Владимировича «Разнообразие и эволюция покровных структур у центрохелидных солнечников (Protista: Centrohelida)», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.04-зоология

Известно, что одними из постоянных компонентов водной и почвенной протистофауны являются центрохелидные солнечники. Они являются консументами одноклеточных и играют важную роль в экосистеме. В России систематические исследования центрохелид стали проводиться лишь в последнее время.

Центрохелидные солнечники – это таксон протистов, объединяющий более ста морских и пресноводных видов. Традиционно идентификация видов центрохелид ведётся на основании морфологии покровных структур. Разнообразие этой группы пока охарактеризовано крайне неполно. Существует мало данных о стабильности скелетных элементов внутри одного клона или вида и в течение жизненного цикла. Ясно, что морфологические данные нуждаются в проверке молекулярно-филогенетическими методами. Плодотворным выглядит и обоснование основных эволюционных преобразований покровных элементов.

**Актуальность работы** не вызывает сомнений ввиду значимости изучения центрохелидных солнечников как одних из самых интересных и широко распространенных в водоемах протистов, но слабо исследованных.

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.

Квалификационная работа В.В.Златогурского (далее автора диссертации) состоит из введения, трёх глав («Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и Обсуждение»), выводов, заключения и списка литературы. Основное содержание, изложенное на 138 страницах, содержит 3 таблицы и множество рисунков. Список литературы содержит 99 источников, из них 89 на иностранных языках.

Цель данной работы заключалась в изучении разнообразия и путей эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников. Были поставлены следующие задачи: изолирование штаммов из различных местообитаний, изучение их методами световой и электронной микроскопии, секвенирование гена 18S рРНК; описание новых видов, изучение стабильности покровных структур у центрохелидных солнечников, реконструкция архетипов эволюции покровных структур и другие.

Для разрешения таких ключевых проблем как филогенетическое родство солнечников со сходными покровами, стабильность покровных структур в пределах клона, эволюция покровных структур В.В.Златогурским впервые проведено исследование клональных культур солнечников с применением всего комплекса как морфологических, так и молекулярно-филогенетических методов. В этом заключается **Научная новизна** и **теоретическая значимость** работы.

Во **Введении** рассматривается актуальность, цель и задачи работы. Замечаний по тексту Введения нет.

**Глава 1** посвящена **Обзору литературы**, куда входят общая характеристика центрохелидных солнечников, их покровные структуры, эволюция покровных образований, систематический обзор центрохелидных солнечников. 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. Диссертанту удалось составить очень обширный обзор данных по морфологии, экологии и филогении центрохелид. Трудно переоценить объем и детализацию такой большой систематизированной работы. На мой взгляд, диссертант сумел найти практически всю имеющуюся литературу по данному вопросу и составить

общую картину данных по исследованию центрохелид. Такой обзор представляет самостоятельный интерес для науки. **Замечаний** по главе 1 нет.

В **Главе 2** рассматриваются Материал и методы исследования и дается характеристика изученных биотопов.

Материалом для исследования послужили пробы, отобранные автором диссертации в ходе его работы на внутренних озёрах Валаамского архипелага и других водоёмах Северо-запада России, а также пробы из различных пресноводных местообитаний Дании, Швейцарии, Крайнего севера России, Дальнего Востока России, а также Южной Африки, имевшиеся в распоряжении группы протистологии кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ. Ясно, что такое количество проб оказалось достаточным для активной работы.

Всего в ходе работы было высеяно 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 Великобритании. Это крупное достижение диссертанта.

Автором диссертации разработана удобная схема морфометрических измерений клеток солнечников. Математическая обработка числовых данных соответствовала современным подходам, оправдана и **достоверна**. В данном случае стоит отметить, что большинство исследователей не приводят статистических данных по размерам клеток. Работа В.В.Златогурского существенно выигрывает в этом плане.

Среди крупных достижений автора диссертации следует указать на сочетание микроскопического и молекулярно-биологического подходов в исследовании центрохелид, тогда как большинство современных авторов приводят лишь размах числовых значений измерений. Все используемые автором диссертации морфометрические и филогенетические методы, включая выделение клональных культур, являются современными и поднимают на новый уровень изучение этих протистов.

**Замечания.** В Методах не указаны подробно методы высушивания объектов и их химической фиксации (не указаны температура, формула фиксатора, отмывка объектов, длительность фиксации и другие важные характеристики). К сожалению, автор диссертации указывает только видовое название солнечника и

место сбора. Между тем в таких случаях необходимо указывать номер-идентификатор штамма в связи с тем, что к одному виду причисляются несколько различных штаммов. В результате не возникает путаницы.

Однако, В.В.Златогурский постоянно при описании и упоминаний штаммов использует не только название вида, но и место его нахождения. Лучше использовать код в коллекции. В.В.Златогурский часто употребляет полное название видов с указанием авторов. Это не является необходимым в большинстве случаев. Достаточно указать это один раз или повторить в случае таксономической ревизии.

**Глава 3** посвящена исследованию собственно результатам работы и их обсуждению. Полученные В.В.Златогурским данные демонстрируют, что необходимо не просто описание новых видов, а комплексный подход, включающий выделение чистых клональных культур, изучение их с помощью полного комплекса современных методов, грамотное сопоставление полученных данных с опубликованными данными по светомикроскопической морфологии, ультраструктуре и молекулярной филогении центрохелид. Можно согласиться в том, что только такой подход позволяет идентифицировать и учитывать в самых различных исследованиях солнечников. Как раз В.В.Златогурский и применял такой комплексный подход. В мире насчитывается очень мало чистых культур центрохелид. Автору удалось получить множество культур.

Среди важных достижений диссертанта следует отметить следующие.

Диссертант по каждому описываемому виду приводит светооптические фотоснимки (фазово- и интерференционно-контрастная оптика), фотографии, полученные в сканирующем и трансмиссионном микроскопе. Все они отличного качества и соответствуют высоким требованиям самых рейтинговых зарубежных журналов.

Обнаружены и регулярно получены цисты в жизненном цикле центрохелид. Ранее таких результатов никто не получал. Доказано, что чешуйки трофических стадий в некоторых случаях могут не являться единственным и достаточным признаком для описания и идентификации видов. Обнаружено, что морфологические и морфометрические характеристики как трофозоитов, так и чешуек изученных штаммов совпадали с параметрами в оригинальных описаниях,

что говорит о ко-специфичности изученных штаммов в рамках существующей морфологической концепции вида у центрохелидных солнечников. Таким образом, если сравнить между собой именно чешуйки трофической стадии, то описание и идентификация видов может осуществляться на основе морфологии покровных структур.

Интересным представляются данные о формах с симбионтами, которые возможно представляют собой самостоятельные виды (подобно *Paramecium bursaria* среди инфузорий), однако, возможно, что захват хлорелл у двух изученных видов солнечников происходит факультативно и вызывает увеличение как диаметра клетки, так и размеров покровных структур. Из топологии молекулярно-генетического дерева следует, что данный модус покровных образований — тангентальные кремниевые чешуйки, при отсутствии радиальных возник в двух отрядах центрохелид совершенно независимо

В.В.Златогурскому удалось доказать, что *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.

Полученный В.В.Златогурским результат – сочетание в пределах одного рода форм с контрастно отличающейся морфологией чешуек показывает, что роды солнечников не всегда надёжно разделяются на основании морфологии покровных структур. Однако, в целом, морфологические характеристики и морфометрия несомненно указывают на ко-специфичность исследованных культур в рамках имеющейся морфологической концепции вида у центрохелидных солнечников.

Стоит отметить прекрасные светомикроскопические фотографии клеток, выполненные автором диссертации. Качество их полностью соответствуют таковым у крупных специалистов и часто превосходят их.

Молекулярно-филогенетический анализ (рис. 17) подтвердил близкое родство ко-специфичных штаммов из различных местообитаний. Как *Acanthocystis nichollsi* так и *Acanthocystis takahashii* сформировали на дереве хорошо

поддержанные клады. Таким образом, 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. Это важный вывод из представленной работы. В.В.Златогурский показал, что для разрешения этого вопроса требуется выделение и комплексное изучение дополнительных штаммов обоих видов. Одна из гипотез В.В.Златогурского заключается в том, что, если симбионт-содержащие и бесцветные штаммы будут образовывать на молекулярно-филогенетических деревьях обособленные клады, то это будет говорить в пользу того, что это разные виды. В случае смешанного распределения зелёных и бесцветных солнечников наличие хлорелл и увеличение размеров следует считать факультативным внутривидовым явлением. Это интересное заключение, требующее новых исследований.

Полученные результаты представляют основу для инвентаризации биоразнообразия солнечников разнотипных водоемов. Приведенные в работе видовые диагнозы, фотографии клеток, СЭМ-снимки перипластов и чешуек центрохелидных солнечников могут быть рекомендованы к использованию в качестве определителя данной группы протистов. Полученные В.В. Златогурским результаты актуальны, научно значимы и имеют перспективу развития.

#### **Замечания** по главе 3.

В.В.Златогурский не приводит общей таблицы жизненных циклов изученных центрохелид. Отсутствует также сборная таблица с указанием химического состава скелетных элементов, что было бы очень полезно.

Хотя В.В.Златогурский представил по каждому виду много фотографий, полученных с помощью сканирующего микроскопа, на мой взгляд, не надо было экономить место, а привести больше фотографий чешуек и спикул, чтобы показать их изменчивость. Это относится, например, к рис. 41. Я уверен, что у диссертанта имеется значительно больше фотографий скелетных элементов. Так, в частности, отсутствуют в большом увеличении фото плоских чешуек и детали фурук и оснований на рисунке 40.

На странице 103 приводится описание нового вида без указания видового названия. Также автор поступил и с некоторыми другими новыми видами (стр.

109, 116 и др.). Желательно было бы присвоить видовое название и поместить описания в рукопись статьи, принятой к печати.

Важным упущением является то, что на большинстве фотографий отсутствуют обозначения клеточных структур. Обычно такие обозначения присутствуют на всех фотографиях. Ясно, что любой специалист найдет описываемые структуры, например, бороздки, фурки и так далее на рисунках, но обозначения существенно поясняют рисунки.

Особенно важным был бы показ кончика фурок при большом увеличении. Это дополняет фото всей чешуйки. Например, у *Acanthocystis kirilli* (рис. 39) пластинчатые чешуйки овальной формы с маргинальной каймой и центральным ребром, радиальные чешуйки, несущие на вершине по 2 (в редких случаях - 3) зубца. Однако, эта кайма почти незаметна, а 3 зубца не видно, или не указано на рисунке. Вероятно, автор диссертации просто попытался уместить на одной странице все фото одного вида, исключив дополнительные фото. У данного вида на рисунках заметно искривление стержня радиальных чешуек. В тексте об этом ничего не написано и не объяснено.

В диссертации мало обсуждается две существенные проблемы: вариабельность количества фурок и зубцов и ее значение для определения видов, а также вариабельность наличия мелких гранул на плоских чешуйках, как возможное влияние условий фиксации на эти гранулы. Могут ли мелкие гранулы отсутствовать после неудачной фиксации? Может ли маскироваться исчерченность плоских чешуек как следствие фиксации?

**Выводы** В.В.Златогурского достаточно обоснованы и подтверждены приводимыми данными. Среди выводов следует отметить те, которые отличаются принципиальной новизной. Так, доказано, что при описании и последующей идентификации солнечников необходимо учитывать признак строения цистных чешуек. А 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. **Достоверность** выводов и научных положений не вызывает сомнений.

В кратком **Заключении** диссертант показал, что в двух отрядах солнечников – Acanthocystida и Pterocystida эволюция может идти параллельными путями. Это важный филогенетический вывод.

В целом можно утверждать, что научные положения, выводы и рекомендации, сформулированных в диссертации полностью обоснованы приводимым материалом, в частности, изложенные в публикациях.

**Научные положения** и рекомендации диссертации полностью обоснованы. Материал в **автореферате** изложен четко и понятным языком. Основные положения работы опубликованы в ведущих зарубежных протистологических журналах и прошли апробацию на международных конференциях. Материал полно представлен в публикациях. Собственный вклад В.В.Златогурского не вызывает сомнения. В целом работа Златогурского Василия Владимировича представляет несомненный научный и практический интерес. Работа носит новаторский характер, соответствует мировому научному уровню.

**Практическая** значимость работы определяется тем, что результаты данного исследования используются в курсах, реализуемых на кафедре зоологии беспозвоночных СПбГУ, а именно: «Протисты: клетка-организм», «Зоологические киноэкскурсии», «Разнообразие живого: протисты». Результаты работы были доложены на Европейском Протистологическом конгрессе и других съездах, а также на научных семинарах кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ. Это означает, что научная общественность ознакомлена с данной работой. Все приводимые автором диссертации описания центрохелид можно использовать как дополнение к существующим определителям этих протистов.

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.

Автореферат и представленные публикации, посвящённые исследованию разнообразия и эволюции покровных структур у центрохелидных солнечников (Protista: Centrohelida), полностью отражают содержание диссертации.

**Публикаций** такого высокого уровня для подобной работы вполне достаточно.



Диссертация соответствует пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ. Соискатель Златогурский Василий Владимирович, безусловно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.04 - зоология (биологические науки).

05.09.2014

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник

Учреждения Российской академии наук

Института биологии внутренних

вод им. И.Д.Папанина РАН

доктор биологических наук *А.М.Молов* Мыльников Александр Петрович

152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, ИБВВ РАН

тел: (48547)24533, факс: (48547)24042

e-mail: ap.mylnikov@rambler.ru

Личную подпись д.б.н. Александра Петровича Мыльникова удостоверяю

Заместитель Директора ИБВВ РАН

д.б.н., профессор

Ю.В.Герасимов

