

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Карпова Сергея Алексеевича на диссертационную работу Дениса Викторовича Тихоненкова «Гетеротрофные жгутиконосцы: новые ветви филогенетического древа эукариот и факторы формирования разнообразия и структуры сообществ в разных средах», представленную в диссертационный совет Д002.036.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 – зоология

С появлением в обиходе биологов методов молекулярной филогении все таксоны эукариот основанные на морфологических признаках подвергаются кардинальной перестройке. Процесс этот происходит довольно болезненно для привыкших к классическим методам анализа биологов, но метод открывает невиданные ранее перспективы для создания естественной системы организмов и, конечно, будет доминировать в будущем. Задача состоит в том, чтобы наполнить морфологическим содержанием новые, установленные молекулярной филогенией родственные связи и представить пути эволюции фенотипов. С этой точки зрения, ревизия таксонов после вмешательства «молекуляристов» является одной из основных и актуальнейших задач современной биологии.

Диссертационная работа Тихоненкова Д.В. посвящена реконструированию древа жизни эукариотных организмов – глобальной, комплексной и крайне сложной задачи. Молекулярная филогения прояснила многое в эволюции эукариот. В последнее время этот процесс продолжается благодаря филогеномным построениям с использованием больших наборов мультигенных данных, повышающих достоверность получаемых филогенетических сценариев. В результате, глобальное древо эукариот в последние десятилетия претерпело значительные изменения. Вместе с тем, углубляется понимание взаимоотношений между супергруппами эукариот, хотя на древе по-прежнему остаются дискуссионные узлы ветвлений между супергруппами. Не удается полностью решить проблему и одиночных, так называемых «глубоких» линий эукариот.

Другой актуальной темой, которой посвящена вторая часть диссертации, является разнообразие гетеротрофных жгутиконосцев в морских, пресноводных и почвенных средах обитания, а также факторы формирования сообществ. Работы по экологии протистов сместились в настоящее время в метагеномику. Теперь уже не достаточно только определения найденных в водоеме или почве жгутиконосцев, а необходимо получить их сиквенсы и определить их место на филогенетическом древе. И это очень важная задача, которая частично решает проблемы видов двойников, скрытого разнообразия, несравнимо большего

генетического разнообразия по сравнению с морфологическим. Собственно, последнее ярко проиллюстрировано в представленной диссертации.

Диссертационная работа состоит из двух томов: основного текста и приложения с рисунками. Она построена по стандартной схеме, ее объем и структура приведены в автореферате, который полностью отражает содержание диссертации.

Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования даны во введении и с этим трудно не согласиться. Могу только добавить, что все, кто занимается проблемами эволюции, молекулярной филогении и систематики, ищут наиболее глубоко ветвящиеся таксоны на древе эукариот. Это сложная задача, которая в значительной степени определяется удачей. Диссертант выбрал стратегию поиска и исследования хищных жгутиконосцев и этот новый методологический подход превзошел все ожидания. Выделяя хищных жгутиконосцев мы обнаруживаем, что они похожи внешне и имеют одинаковую стратегию питания, но генетически оказываются далеко удалены друг от друга, находясь в разных суперкластерах. Причем, они чаще, чем бактериотрофы дают те самые глубокие ветви в суперкластерах, указывая нам образы возможных предков той или иной группы эукариот.

Если первые работы Д.В. Тихоненкова по теме экологии и биоразнообразия были опубликованы в 2005-м году, то по молекулярной филогении только в 2011-м. Т.е. за сравнительно короткое время диссертант освоил не только методы молекулярной филогении по отдельным генам, но и филогеномику и приобрел биоинформатические навыки. В последние 5-6 лет он стал одним из хорошо известных в мире экспертов по геномным и филогенетическим исследованиям протистов. Поэтому лично у меня не возникает сомнений в его ведущем личном участии на всех этапах работы от постановки цели и задач до заключительных теоретических обобщений.

Результаты работы хорошо известны научной общественности в нашей стране и за рубежом. Они представлены на многих отечественных и международных научных конференциях и съездах, по теме диссертации опубликовано 104 работы. Правда, половина из них тезисы, но среди других 1 монография и 49 статей в журналах индексируемых в WoS и Scopus. Причем, несколько работ опубликовано в журналах Current Biology и PNAS, что действительно свидетельствует о высочайшем уровне исследований диссертанта.

Из главы «Материалы и методы исследований» следует, что Д.В. Тихоненков владеет всеми необходимыми методами протистологии, с самых первых этапов исследований (сбор материала, определение объектов и выделение культур) до

молекулярно-биологических, включающих геномные и транскриптомные методы, а также биоинформатического анализа полученных результатов. Именно такой комплексный подход и позволил автору выполнить весьма значимую работу в течение короткого времени.

Переходя к анализу результатов диссертации остановимся на том, что дали исследования хищных жгутиконосцев, выделенных автором из разных районов нашей планеты, но удивительно сходных морфологически и по типу питания.

Сиквенсы двух новых изолятов из Вьетнама и Чили вошли в состав филастерид – сестринской группы Choanoflagellata+Metazoa, а сиквенс третьего изолята (из Перу) сгруппировался с одиночной ветвью *Corallochytrium*. На основании изучения морфологии и молекулярной филогении этих трех изолятов были описаны два новых рода *Pigoraptor* и *Syssomonas*, в пределах Holozoa сформирована новая клада Pluriformea, которая ответвляется сразу после ихтиоспоровых. Анализ генов, связанных с многоклеточностью у животных, показал, что новые филастериды имеют набор генов клеточной адгезии, сходный с таковым у других представителей этой группы. *Syssomonas* (Pluriformea) в целом имеет меньший набор таких генов, но кодирует гены, отсутствующие у филогенетически более базальных ихтиоспоровых, например, внеклеточный фибронектин. Таким образом, поиски предка многоклеточных животных смещаются от хоанофлагеллат гораздо ближе к основанию Holozoa, чем считалось ранее, и это правильно.

Изучение второй группы хищных жгутиконосцев (*Colpodellida*, *Colponemida* и близких видов) преребрасывает нас из опистоконтов в группу альвеолат. Морфологические и молекулярно-биологические данные, включая геномный анализ, по *Colponema*, *Acavomonas* и *Palustrimonas* убедительно свидетельствуют, что представители этих родов дают глубокие ветви филогенетического дерева альвеолат уровня «типа» эукариот. Эти данные позволяют представить общего предка всех альвеолат, который более всего похож на *Colponema*.

Третья группа изолятов хищных жгутиконосцев - новый род *Aquavolon* с двумя новыми видами, выделенные в новый отряд Aquavolonida – это уже ризарии. Эти жгутиконосцы дают одну из наиболее глубоких ветвей среди ризарий и также позволяют аргументированно обсуждать общего предка этой богатой видами супергруппы.

Представители четвертой группы хищных жгутиконосцев найдены в пустыне Марокко и описаны автором как новый род и вид *Moramonas marocensis*, представляющий и новое семейство Moramonadidae. Это типичные якобиды, которые относятся к еще одному суперкластеру Excavata. Они сходны с экскаватами по строению цитоскелета и общей морфологии клетки, а также по большому числу генов в митохондриальном геноме и

наличию в нем бактериальных черт, что отличает экскават от других эукариот и, по-видимому, указывает на их близость к общему предку эукариот.

Еще одна группа новых хищных протистов также входит в состав экскавата, но относится к другой ветви – кинетопластидам. Причем, вместе с несколькими природными сиквенсами они занимают самое глубокое положение в основании древа кинетопластид и формируют группу Prokinetoplastina. Полученное автором филогенное древо подтверждает позднее возникновение трипаносоматид среди Kinetoplastea и парафилетичность трех основных групп Metakinetoplastina. Интересно, что у свободноживущего *Moramonas*, также как у паразитических трипаносоматид, имеется редактирование митохондриальных РНК, и захватывает больше генов, чем у других кинетопластид. Таким образом, редактирование мРНК в митохондрии не связано с паразитическим образом жизни и сменой хозяев, как это считалось ранее, а присутствовало, по-видимому, у предка кинетопластид.

Наиболее амбициозные выводы связаны с изучением *Ancoracysta twisti*, похожего на колподеллу жгутиконосца, с которым автор связывает происхождение эукариот, говоря точнее, предлагает этого жгутиконосца в качестве модели предковой формы всех эукариот. Поэтому разберем этот раздел детальнее.

Относительно уникальной морфологии. Описание «уникальных» клеточных покровов «включающих плазмалемму и плотную оболочку (теку), состоящую из трех тонких внешних слоев и одного ламеллярного слоя, отделенного широким пространством, заполненным везикулами в некоторых участках.» не корректно. Судя по приведенным электронограммам (рис. 1.5.1, 1.5.2) снаружи клетка покрыта плазмалеммой, под которой лежат крупные вакуоли с пузырьками внутри. Конечно же, нельзя называть внутреннюю мембрану таких вакуолей плазмалеммой, как это сделано в диссертации. Такие покровы есть у других хищных жгутиконосцев, например, *Develorapax* (Aleshin et al. 2016), у бактериотрофной *Developayella* (Tong 1995), а также, по признанию самого автора, у колподеллид. То же касается «уникальных» анкороцист, которые также по указанию автора присутствуют у колподеллид, *Metopion fluense*, *Metromonas simplex* и *Telonema subtilis* (стр. 203). Скорее всего, такой тип экстрасом удачно зафиксировался у анкороцисты и поэтому был описан в деталях в отличие от прежде изученных хищников.

Филогенетическое положение *Ancoracysta twisti*. На рисунках рис. 1.5.4 и 1.5.5, на которые ссылается автор, приведены данные мультигенной филогении на основе проведенного Д.В. Тихоненковым анализа транскриптома. Обе схемы свидетельствуют о группировке анкороцисты с гаптофитами и центрохелидными солнечниками, хотя поддержки действительно низкие. Хотя положение этого жгутиконосца нестабильно на общем древе

эукариот, насколько мне известно, он не группируется с экскаватами. Хотя именно это и свидетельствовало бы о древности его происхождения и близости к корню древа эукариот, поскольку размер митохондриального генома анкорацисты даже больше, чем у экскават.

Как бы то ни было, все представленные в первой части диссертации результаты исключительно новы, современны и своевременны, а главное, затрагивают и помогают решать глобальные проблемы биологии.

Вторая часть работы, посвященная изучению факторов среды в формировании сообществ гетеротрофных жгутиконосцев, органично сочетается с материалами первой части диссертации. Вполне логично, что Д.В. Тихоненков сначала разобрался где и как нужно искать редкие виды жгутиконосцев, чтобы сделать исключительную по важности работу по генетическому разнообразию хищных жгутиконосцев. Я не считаю себя экспертом в экологии протистов, поэтому при полном одобрении содержания всей второй части ограничусь только одним замечанием: ее название никуда не годится. Можно подумать, что жгутиконосцы и есть факторы формирования разнообразия (какого?).

Выводы диссертации полностью вытекают из проделанной работы, но сформулированы неудачно. Выводы с первого по пятый, по сути, резюме результатов. Учитывая докторский уровень диссертации, нужно было сделать выводы не о том, например, что описаны новые рода и виды протистов или открыт новый тип стрекательных органелл, а сразу указать на принципиально новое понимание проблемы происхождения животных, описание путей эволюции митохондриального генома эукариот, открытие новых базальных ветвей в каждом из 4-х суперкластеров, которые приводят к пересмотру общей системы эукариот.

В заключение хотелось бы отметить хорошую особенность диссертации. Учитывая большой объем работы, автор приводит в конце каждой главы заключительные замечания, которые позволяют читателю легче воспринимать материал, а самому автору порой точнее сформулировать основные положения.

Диссертационная работа Д.В. Тихоненкова - полноценное законченное научное исследование, основанное на всестороннем и глубоком анализе большого фактического материала. Она имеет очень важное, прежде всего, теоретическое значение для решения общебиологических проблем. Материалы этой работы могут быть использованы и уже используются в лекционных курсах по эволюции, филогении и экологии протистов.

Диссертация написана хорошим языком, легко читается. Стилистических ошибок мало, но встречаются, главным образом, это жаргонизмы или прямая транслитерация английских слов. В общем, это нормально, когда требуется быстро написать 600

страниц текста. Опечатки редки.

Змечания по существу. Кроме приведенных выше замечаний по анкорацисте предлагаю для обсуждения: «При этом, в присутствии клеток *Syssomonas* в чашках Петри происходит быстрое разрушение зерна риса ... (рис. 1.1.21). Возможно, у *Syssomonas* происходит экзоцитоз гидролитических ферментов, обеспечивающих примембранное неклеточное пищеварение. » (стр. 78) – внеклеточное пищеварение - особенность грибов. Хорошо бы обсудить наличие/отсутствие целлюлаз у *Syssomonas* в этой связи.

Неточности при описании ультраструктуры: «Запасные вещества ... (вероятно, гликопротеиновыми)» (стр. 67 и др.) – почему не липидными? – очень похожи. При описании *Pigoraptor* кинетосомы «не соединены видимыми фибриллами (рис. 1.1.15 А– F).» На самом деле соединены, просто серия срезов неудачна - мостики срезаны поперек, поэтому не очевидны, но явно имеются. При описании экзоцитоза непереваренных остатков неоднократно: «Экзоцитоз сопровождается разрывом и фрагментацией плазмалеммы» – это не так: на всех фото плазмалемма не разорвана – обычный экзоцитоз.

Таксономия: В описании видов рода *Pigoraptor*: «Соответствует диагнозу рода *Pigoraptor*.» - зачем эта фраза, если дальше таки следует описание вида, который относится к роду *Pigoraptor*?

Некоторые примеры плохого стиля: ядро хозяйской клетки (стр. 20); эукариот-эукариот эндосимбиозов (стр. 23 и 24); компоненты «интегриновой адгесомы» и тирозиновой сигнализации сильно апрегулируются (стр. 58); возникновение животноподобной структуры внеклеточного матрикса (стр. 59); адгезивные белки кадгерины чаще всего названы кадеридами, но еще и кагеридами и кареридами; Насыщенные (имеются ввиду насытившиеся) клетки; Колпонема питается фагоцитозом, ... не питается мизоцитозом (стр. 114) – здесь и далее: они питаются бактериями или другими эукариотами, а не типом питания. На стр. 135 повтор абзаца со стр. 97. Часто встречается «родственники» при описании родства организмов. Например, «по молекулярным данным он родственнее паразитическим споровикам, чем другим фотосинтетическим альвеолятам – динофлагеллятам» (стр. 95). Это, как минимум, неточно - все мы родственники так или иначе, важно: в ближнем или дальнем родстве состоим. Глава **Гетеротрофные свободноживущие споровики: колподеллиды** написана рыхло, встречаются повторы.

Все приведенные замечания либо являются дискуссионными, либо редакторскими и никак не умаляют достоинств фундаментальной работы, и ни в коей мере не ставят под сомнение полученные результаты.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертация Д.В. Тихоненкова «Гетеротрофные жгутиконосцы: новые ветви филогенетического древа эукариот и факторы формирования разнообразия и структуры сообществ в разных средах» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации (№842 от 24.09.2013 г.), и требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Д.В. Тихоненков, безусловно, достоин присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 – «Зоология».

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, главным научным сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт» Российской академии наук Карповым Сергеем Алексеевичем (докторская диссертация защищена по специальности 03.00.08 - «Зоология», диплом ДК № 017828, от 05.02.1993г.).

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт» Российской академии наук
e-mail: sergei.karpov@zin.ru

Карпов
Сергей Алексеевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Зоологический институт»
Российской академии наук
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. д.1
Тел.: (812) 328-03-11
Факс: (812) 328-29-41, (812) 328-02-21,
(812) 714-04-44
E-mail: admin@zin.ru, office@zin.ru,
WWW: <http://www.zin.ru>

23 октября 2018 г.



В диссертационный совет Д 002.036.02
при Институте биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН

Я, Карпов Сергей Алексеевич, даю согласие выступить официальным оппонентом по диссертации Тихоненкова Дениса Викторовича на тему «Гетеротрофные жгутиконосцы: новые ветви филогенетического дерева эукариот и факторы формирования разнообразия и структуры сообществ в разных средах», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 – зоология.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

1. Ученая степень, ученое звание, отрасль науки и научная специальность, по которой защищена диссертация: доктор биологических наук, профессор, биологические науки, зоология
2. Место работы (полное наименование организации): Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской академии наук
3. Сокращенное наименование организации: ФГБУН ЗИН РАН
4. Почтовый адрес организации с указанием индекса: Университетская наб., д. 1, Санкт-Петербург, 199034.
5. Адрес официального сайта в сети Интернет: https://www.zin.ru/index_r.htm
6. Название структурного подразделения: лаборатория по изучению паразитических червей и протистов
7. Должность: главный научный сотрудник
8. Телефон с указанием кода города: +7 905 219 11 09
9. Адрес электронной почты: sakarpov4@gmail.com
10. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
 1. **Karpov SA**, Mikhailov KV, Mirzaeva GS, Mirabdullaev IM, Mamkaeva KA, Titova NN and Aleoshin VV. (2013) Obligately Phagotrophic Aphelids Turned out to Branch with the Earliest-diverging Fungi. *Protist* 164, pp. 195-205
 2. **Karpov SA**, Kobzeva AA, Mamkaeva MA, Mamkaeva KA, Mikhailov KV, Mirzaeva GS, Aeoshin VV. 2014. *Gromochytrium mamkaevae* gen. et sp. nov. and two new orders: *Gromochytriales* and *Mesochytriales* (*Chytridiomycetes*). *Persoonia* 32: 115–126
 3. **Karpov SA**, Mamkaeva MA, Aleoshin VV, Nassonova E, Lilje O and Gleason FH (2014) Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Front. Microbiol.* 5:112. doi: 10.3389/fmicb.2014.00112
 4. Lepelletier F, **Karpov SA**, Le Panse S, Bigeard E, Skovgaard A, Jeanthon C, Guillou L. 2014 *Parvilucifera rostrata* sp. nov. (Perkinsozoa), a Novel Parasitoid that Infects Planktonic Dinoflagellates. *Protist*, 165, 1, 31-49
 5. Harder CB, Ekelund F, **Karpov SA**. 2014. Ultrastructure and phylogenetic position of *Regin rotiferus* and *Otto terricolus* genera et species novae. (Bicosoecida, Heterokonta/Stramenopiles). *Protist* 165, 2, 144-160.

6. Lepelletier F, **Karpov SA**, Alacid E, Le Panse S, Bigeard E, Garcès E, Jeanthon C, Guillou L. 2014. *Dinomyces arenysensis* gen. sp. nov. (Rhizophydiales), the first chytrid infecting marine dinoflagellates. *Protist* 165, 230–244
7. Gleason FH, **Karpov SA**, Lilje O, Macarthur DJ, van Otgen FF and Sime-Ngando T. 2014. Chapter 13. Zoosporic parasites of phytoplankton. In: Jones, E.B.G., Hyde, K.D. and Pang, K.L. eds. *Freshwater Fungi and Fungal-like organisms*. De Gruyter, Berlin, Germany, pp.273-298.
8. **Karpov SA**, Mamkaeva MA, Benzerara K, Moreira D and López-García P. 2014. Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium* aff. *melosirae* (Aphelida, Opisthosporidia). *Protist*. 165, 512-526
9. Gleason F.H., Jephcott T.G., Küpper F.C., Gerphagnon M., Sime-Ngando T., **Karpov S.**, Guillou L. and Ogtrop F.F. (2015) Potential roles for recently discovered chytrid parasites in the dynamics of harmful algal blooms. *Fungal Biology Reviews*. V. 29, Iss.1: 20-33
10. Jephcott T.G., Alves-de-Souza C., Gleason F.H., Ogtrop F.F. Sime-Ngando T., **Karpov S.**, Guillou L. (2016) Ecological impacts of parasitic chytrids, syndinales and perkinsids on populations of marine photosynthetic dinoflagellates. *Fungal Ecology* 19: 47-58.
11. Karpov S.A. (2016) Flagellar apparatus structure of choanoflagellates. *Cilia* 5: 11. DOI: 10.1186/s13630-016-0033-5
12. Pozdnyakov I.R. and **Karpov S.A.** 2016. Kinetid Structure in Choanocytes of Sponges (Heteroscleromorpha): Toward the Ancestral Kinetid of Demospongiae. *J. Morph.* 277 (7): 925–934.
13. Aleoshin VV, Mylnikov AP, Mirzaeva GS, Mikhailov KV and **Karpov SA** (2016) Heterokont Predator *Develorapax marinus* gen. et sp. nov. – A Model of the Ochrophyte Ancestor. *Front. Microbiol.* 7:1194. doi: 10.3389/fmicb.2016.01194
14. **Karpov SA**, Tsvetkova VS, Mamkaeva MA, Torruella G, Timpano H, Moreira D, Mamanazarova KS, López-García P (2016) Morphological and Genetic Diversity of Opisthosporidia: New Aphelid *Paraphelidium tribonemae* Gen. et Sp. Nov. *J Eukaryot Microbiol* 64:204–212.
15. **Karpov SA**, López-García P, Mamkaeva MA, Tsvetkova VS, Vishnyakov AE, Klimov VI, Moreira D. 2018. The Chytrid-like Parasites of Algae *Amoeboradix gromovi* gen. et sp. nov. and *Sanchytrium tribonematis* Belong to a New Fungal Lineage. *Protist*. 169: 122-140. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2017.11.002>

Главный научный сотрудник, лаборатория
по изучению паразитических червей и протистов
ФГБУН Зоологический институт РАН
доктор биологических наук, профессор

Карпов Сергей Алексеевич

