

ОТЗЫВ

официального оппонента по диссертации Жуковой А. А.
«ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТРЕМАТОД РОДА *LEUCOCHLORIDIUM*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальностям 03.02.11 – паразитология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология,
гистология

Актуальность темы диссертации. Диссертация Алины Александровны Жуковой посвящена одной из актуальных проблем современной паразитологии – изучению формированию морфологического и генетического разнообразия спороцист трематод, что чрезвычайно актуально для систематики и филогении всех трематод., а также для анализа такого сложного биологического явления как жизненный цикл трематод. В качестве объекта исследования выбраны трематоды рода *Leucochloridium*, широко известные благодаря уникальной мимикрии, выражающейся в способности формировать отростки, которые формой, окраской и движением имитируют личинок насекомых. Однако проблемы видовой диагностики и филогенетических взаимосвязей внутри этой группы до сих пор остаются нерешенными. Для этих целей весьма перспективным является использованный соискателем подход, основанный на комплексном выявлении любых видо- и родоспецифичных признаков с привлечением традиционных и современных методов морфологии, включая электронную микроскопию, а также современных методов молекулярной биологии и генетики.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 173 страницах, из которых основная часть представлена на 131 странице, приложение – на 42 страницах. Список литературы насчитывает 173 источника, из них 142 на иностранном языке. Диссертация содержит 11 таблиц и иллюстрирована 38 рисунками.

Научная новизна. Все представленные в работе результаты являются новыми. Впервые проведен анализ распределения пигмента в покровах спороцист и с помощью электронной микроскопии охарактеризована структура наружных покровов спороцист трематод рода *Leucochloridium*. Впервые получен протяженный участок рДНК трематод этого рода, кодирующий 18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S для трех видов *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum*. На основании сравнительного анализа протяженных последовательностей рДНК трех изученных видов трематод рода *Leucochloridium* с трематодами из других таксономических групп выявлены отношения видов трематод *Leucochloridium* внутри рода, а также определено систематическое положение семейства Leucochloridiidae.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые обнаружено уникальное явление множественного заражения моллюска *Succinea putris* одновременно тремя видами трематод рода

Leucochloridium: *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. Vogtianum*, которое демонстрирует способность спороцист прободать стенку тела моллюска и выходить во внешнюю среду, препятствуя, таким образом, гиперинвазии моллюска-хозяина. Помимо эволюционной значимости, изученные спороцисты трех видов трематод рода *Leucochloridium* представляет интерес для выяснения механизмов формообразования и клеточной пролиферации генеративных клеток партенит -наименее изученной стадии жизненного цикла трематод. Созданный банк ядерной ДНК трематод рода *Leucochloridium*, последовательности оригинальных специфических праймеров для кластера генов рРНК, а также уникальные электрофоретические RAPD-профили ДНК трех видов трематод рода *Leucochloridium* могут служить для разработки экспресс - тестирования указанных видов.

Введение содержит информацию о степени разработанности морфологической и молекулярно-биологической дифференциации трематод рода *Leucochloridium*, обоснованы цели и четко сформулированы задачи исследования, дана характеристика научной и практической значимости полученных результатов.

Литературный обзор (Глава 1) читается легко и с интересом, написан с использованием последних научных данных и свидетельствует о компетентности автора.

Глава 2, посвященная объектам и методам исследования, реагентам и материалам весьма подробна и свидетельствует о широком арсенале используемых диссертантом методик и методических приемов паразитологии, клеточной биологии и цитологии, молекулярной генетики и биоинформатики, включая морфометрию, различные варианты микроскопического анализа, полимеразной цепной реакции, секвенирование ДНК, а также методы филогенетических реконструкций. Перечисленные методы применялись квалифицировано, и этим определяется достоверность полученных результатов.

Глава 3 содержит изложение результатов исследования и их обсуждение. Показано, что анализ нуклеотидных последовательностей кластера рДНК спороцист *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, как и экспресс-анализ методом RAPD, подтвердил возможность идентификации видов трематод рода *Leucochloridium* на основе таких морфологических признаков, как форма и характер окраски отростков спороцист. При этом полученная с помощью оригинальных специфических праймеров нуклеотидная последовательность кластера генов рРНК трех видов является на данный момент наиболее полной из представленных в GenBank для трематод рода *Leucochloridium*. Филогенетический анализ с использованием нескольких ядерных маркеров (консервативных участков, кодирующих 18S, 5.8S, 28S рРНК и транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2) позволил выявить отношения видов трематод *Leucochloridium* внутри рода, а также определить систематическое положение внутри семейства Leucochloridiidae. Полученные

дендрограммы в основном подтверждают классические филогенетические схемы, основанные на морфологических признаках.

Четыре **вывода** в полной мере отражают содержание диссертации. В автореферате с достаточной полнотой представлены материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа Жуковой Алины Александровны актуальна, полученные результаты достоверны. Все это подтверждается большим объемом исследования и тщательным многосторонним подходом к обработке результатов. Поставленные в работе задачи выполнены полностью. Работа имеет новизну и теоретическую значимость. По результатам исследования опубликовано 4 статьи, 3 из которых входят в список изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Замечания. Принципиальных замечаний к экспериментальной части диссертации не имеется. Можно отметить лишь ряд стилистических неточностей и неоправданное, а иногда неточное использование перевода англоязычных выражений. Например, неправильно использовать термины «бутстрепная поддержка» на стр. 90 и стр. 100, «высокое узловое значение» на стр. 95, «нестационарность нуклеотидного состава» и «неполнота концертной эволюции» на стр. 41 диссертации. Кроме того:

1. В подписи к рисунку 16 не указана видовая принадлежность образцов.
2. В литературном обзоре и обсуждении не используется известный обзор Дэвида Блэера (2006), посвященный использованию последовательностей рДНК для видовой диагностики и филогении трематод разных видов (Blair D. 2006. Ribosomal DNA variation in parasitic flatworm// *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. A. G. Maule and N. J. Marks. London, UK: CAB International., P. 37-80). В этих же разделах не используется и не цитируется ставший уже классическим русскоязычный перевод книги Масатоши Нея и Садхира Кумара «Молекулярная эволюция и филогенетика» (2004г., Киев, Издательство «КВІЦ»).
2. Для филогенетических реконструкций автор использовала три метода. Это кажется излишним, так как один из этих методов, метод максимальной парсимонии (MP) часто приводит к появлению парафилии и дает несопоставимые топологии дендрограмм, построенных двумя другими методами - методом максимального правдоподобия (ML) и методом «ближайшего соседа» (NJ). Это явление продемонстрировано на страницах диссертации на рис. 21В и 24В.
3. Почему для видовой идентификации трематод не использована последовательность митохондриального гена *cox1*? Во-первых, в настоящее время эффективно работает всемирная программа «Barcode in Life», которая направлена на видовую идентификацию биологических объектов различной таксономической принадлежности. Во-вторых, применение указанного

маркера в филогеографических исследованиях зачем-то обсуждается в литобзоре (стр.32). Кроме того, в тексте на стр. 105 диссертации обсуждается работа Heneberg et al., 2016, где исследованы не спороцисты, а мариты трех исследованных видов *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, обнаруженных на территории Чехии и Польши. Секвенирование митохондриального гена *cox1* спороцист позволило бы предположить возможный вид окончательного хозяина птиц для исследованных спороцист лейкохлоридиумов Ленинградской области. Но этот вопрос можно рассматривать как пожелание для дальнейших исследований.

Однако эти замечания не снижают общей высокой оценки данной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Жуковой Алины Александровны «ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТРЕМАТОД РОДА *LEUCOCHLORIDIUM*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.11 – паразитология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является законченным самостоятельным исследованием. Она выполнена на высоком научном уровне. По содержанию, объему выполненных исследований, их новизне, теоретическому и практическому значению работа соответствует требованиям ВАК РФ к кандидатским диссертациям (п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней), так как является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития паразитологии, клеточной биологии, цитологии и гистологии, а именно выявлению видоспецифичных генетических и морфо-цитологических признаков для видовой идентификации, дифференциации спороцист трех видов трематод рода *Leucochloridium* и определения их систематического положения внутри семейства Leucochloridiidae, а ее автор, Жукова Алина Александровна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.11 – паразитология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

24 января 2017 г.

Семенова Серафима Константиновна
Кандидат биологических наук
Старший научный сотрудник лаборатории организации генома
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена РАН Российской академии наук (ИБГ РАН)
119334, г. Москва, ул. Вавилова 34/5
E-mail: seraphimas@mail.ru
Телефон: (7) 499 1359793



ПОДПИСЬ *С.К. Семеновой*
АВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Мансурова Е.В.