ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Николая Александровича ДАВИДОВИЧА

на тему: «РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ»,

представленную на соискание ученой степени

доктора биологических наук

по специальности 03.02.01 – ботаника

Объектом исследования представленной диссертации Н.А. Давидовича являются диатомовые водоросли (отдел Bacillariophyta) – многочисленная и очень разнообразная группа микроскопических одноклеточных водорослей, играющая важную роль в глобальном круговороте веществ и создании первичной продукции. В течение длительного времени (около 300 лет) диатомологи изучали в основном разнообразие форм и деталей строения мертвых кремнеземных панцирей диатомей, характеризующихся высокой видовой специфичностью. Лавинообразное нарастание в последние десятилетия количества описаний новых для науки видов и родов диатомовых водорослей обязано появлению и развитию таких новейших методов исследования, как электронная микроскопия и молекулярно-генетические исследования. Большинство новых описаний все так же основаны на морфологических особенностях ультраструктуры мертвых клеток. Лишь небольшое число исследователей уделяло и уделяет внимание изучению живых клеток диатомовых водорослей. Всего для 1% всех известных видов диатомей описан их жизненный цикл и половое воспроизведение, хотя аспекты репродуктивной биологии являются весьма важными для таксономии, систематики, филогении, биогеографии, необходимы в популяционных и экосистемных исследованиях и при культивировании водорослей. Эти аспекты выдвигают на первый план правильную идентификацию и разграничение таксонов, а также такие дискутируемые проблемы, как космополитизм, эндемизм, существование

комплексов криптических видов диатомей. Все эти проблемы невозможно решить без изучения жизненного цикла, типов полового процесса, принципов определения пола и наследования, связанного с полом, путей воспроизведения, определяющих систему скрещивания, которые досконально и аргументировано рассматриваются в диссертации Н.А. Давидовича и определяют актуальность избранной темы, её теоретическую и практическую значимость.

Диссертация выполнена на огромном фактическом материале 25-летних исследований, проведенных автором на Карадагской научной станции – единственном сохранившимся на всем постсоветском пространстве научном центре, который начинал и продолжает целенаправленные уникальные эксперименты по репродуктивной биологии диатомовых водорослей, а также при участии Н.А. Давидовича в исследованиях лабораторий Канады, Франции, Польши. Его работы известны широкому кругу диатомологов в нашей стране и за рубежом.

Текст диссертации изложен на 302 страницах, включает 81 рисунок и 16 таблиц в тексте, часть иллюстративного материала размещена в Приложении. Диссертация состоит из введения, 12 основных разделов, выводов, заключения, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, списка цитируемой литературы (365 источников, из них 282 на иностранных языках), списков таблиц и иллюстраций и приложения.

Во введении приводятся все традиционные пункты защиты: актуальность, степень разработанности темы, цель и задачи исследований, положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость и т. д. Все разделы введения четко сформулированы и представлены как в тексте диссертации, так и в автореферате. Поэтому позвольте приступить к рассмотрению основного содержания диссертации.

В **разделе 1** представлена история становления взглядов на эволюцию диатомовых водорослей с акцентом на современную систему классификации,

в большей степени отражающей естественные филогенетические отношения в этой группе водорослей. **Раздел 2** является обзором литературных источников, в подразделах которого анализируются публикации, касающиеся эволюции представлений о типах полового процесса, жизненных циклах диатомовых, систем скрещивания и молекулярно-генетических исследований. Последний подраздел посвящен работам уникальной школы диатомологов Карадагской научной станции. Несмотря на большое число проанализированных публикаций, автор пришел к выводу, что целостного понятия о репродуктивной биологии как о самостоятельном направлении исследований в отношении диатомовых пока еще не сложилось.

Учитывая микроскопические размеры диатомовых водорослей, в **разделе 3** подробно описываются применяемые в исследованиях автора микробиологические методы и методы микроскопии. Большое внимание уделяется клонированию и культивированию клонов, без которых невозможно проведение экспериментальных работ по изучению половых отношений, детерминации пола и систем скрещивания. Описываются способы использования световых и электронных микроскопов для наблюдения и фотографирования, а также математической обработки результатов. В целом, **раздел 3** является **самостоятельным научно-методическом руководством**, полезным для практики культивирования водорослей и проведения прикладных работ.

Раздел 4 является одним из центральных и заслуживающим особого внимания. При изучении жизненного цикла (ж. ц.) 17 видов диатомовых водорослей в культуре и в природных популяциях Н.А. Давидовичем установлена не только общая схема ж. ц. диатомей, состоящая из следующих фаз: дорепродуктивной, репродуктивной и пострепродуктивной, но и закономерности изменения размеров клеток в разных фазах ж. ц. Наиболее важные выводы этого исследования: 1) размеры клеток диатомей в течение ж. ц. уменьшаются в 2 и более раз, при этом отмечается пропорциональное и непропорциональное изменение формы клеток; 2) верхнее пороговое

значение размера клеток, пригодное для полового воспроизведения, должно быть близким к 50 % от максимального видоспецифического размера; 3) диапазоны размеров гаметангиальных и инициальных клеток довольно широкие (до 50 % от общего диапазона, характерного для вида), но обычно уже. Н.А. Давидовичем также установлены продолжительность жизненной истории изученных им видов, сроки достижения генеративной фазы, абсолютная и относительная скорость уменьшения размеров клеток. Эти исследования позволили автору самостоятельно или в соавторстве впервые описать и дополнить диагнозы изученных видов водорослей. Раздел хорошо проиллюстрирован микрофотографиями, таблицами и графиками, повышающими достоверность полученных выводов.

Изучение жизненного цикла природных популяций нескольких бентосных видов диатомовых в районе Карадага показало одновременное присутствие в них нескольких размерных групп диатомей, являющихся результатом полового воспроизведения в популяциях. При этом случаи обнаружения клеток, имеющих максимальные видоспецифические размеры, в природных популяциях очень редки, как и случаи наблюдения собственно полового процесса, для вступления в который, кроме наличия полового партнера, необходимо ещё и стечение благоприятных внешних факторов.

В **разделе 5** диссертации Н.А. Давидовичем приводятся детальные описания полового воспроизведения 10 видов диатомей, выполненные при работе с культурами водорослей, выделенными из природных популяций и имеющими важное хозяйственное значение или являющимися токсикогенными. Половые процессы изученных видов поэтапно представлены на сериях микрофотографий (рис. 5.1-5.15). Представленные описания составляют около 3% от всех описаний, имеющихся в общемировой литературе для диатомовых водорослей, и свидетельствуют о значительном вкладе автора диссертации в изучение репродукции диатомей.

Следует отметить, что работа с культурами весьма трудоемкая и требующая определенных навыков и умения по выделению клоновых

культур, их продолжительного содержания, владения методами инициирования полового воспроизведения, а это не всегда удается даже ведущим диатомологам мирового уровня, но успешно осуществляется на Карадагской станции.

Важными и имеющими общебиологическое значение представляются выводы Н.А. Давидовича, заключающие этот раздел: 1) у видов, принадлежащих одному роду, совпадает не только общая схема, но и многие детали полового процесса, то есть схема полового воспроизведения является **родоспецифической характеристикой**; 2) появление расхождений в типах или отдельных деталях полового процесса влекут за собой возникновение репродуктивной изоляции, которая, по сути, является **фактором видообразования**. Эти выводы важны и должны учитываться всеми систематиками и таксономистами, выделяющими и описывающими новые виды.

В **разделе 6** представлены многочисленные экспериментальные работы автора с культурами водорослей по выявлению влияния абиотических факторов на половое воспроизведение диатомовых водорослей, таких как температура, соленость, режим, интенсивность и спектр освещения. Результаты экспериментов показали, что ауксоспорообразование у диатомей происходит в определенном диапазоне значений физических факторов с характерным для каждого вида оптимумом, обеспечивающим появление наибольшего количества генеративных клеток как при гетеро-, так и при гомоталличном воспроизведении.

Особый интерес вызывает подраздел 6.3, в котором всесторонне обсуждаются результаты экспериментов с воздействием освещения на половое воспроизведение. Автором показано, что для успешного ауксоспорообразования необходимо взаимодействие или комбинация продолжительности фотопериода и уровня освещения, при этом оптимум уровня освещенности для ауксоспорообразования существенно ниже, чем для вегетативного размножения, а непрерывное освещение, даже слабой

мощности, ингибирует вступление в половой процесс у многих видов диатомей. В ходе экспериментов также было установлено влияние синего и красного света на половую репродукцию: при синем свете воспроизведения не происходит, а наличие в оптическом спектре красных лучей обуславливает гаметогенез и ауксоспоруляцию. Было выяснено, что динамика уровня освещенности во времени может выступать не только как фактор сексуализации, но и как фактор индукции или сигнал, который заставляет сексуально индуцибельную клетку перейти от обычных митотических делений к последовательности событий, ведущих к мейозу при половом воспроизведении. Экспериментальным путем показано, что сексуальная индукция происходила только в том случае, если клетки в ранней светозависимой фазе **G1** клеточного цикла содержались при пониженной освещенности или в темноте. Отсутствие периода темноты в этой фазе неизбежно приводило к отрицательным результатам в отношении гаметогенеза. По сравнению с митозом мейотическое деление и его подготовительные этапы более чувствительны к действию факторов среды. Клетки водоросли могли приступить к половому воспроизведению, не будучи в достаточной мере обеспеченными запасными веществами для его нормального завершения. Однако, если энергетических и субстратных запасов, накопленных в родительских клетках, оказывалось достаточно, все этапы полового воспроизведения успешно проходили в темноте, включая формирование инициальных клеток.

В **разделе 7** рассматриваются несколько способов движения гамет, которые являются ключевыми при осуществлении сингамии. При изучении полового воспроизведения бесшовного пеннатного вида *Tabularia fasciculata* был обнаружен особый механизм перемещения гамет за счет формирования цитоплазматических выростов на поверхности мужских гамет. Распространение выростов на значительное расстояние во много раз повышало вероятность сингамии. Кроме того, сворачивание цитоплазматических нитей вызывало вращательно-поступательное движение

мужских гамет, придающее движению хаотический характер, но при этом повышало вероятность столкновения с гаметами противоположного пола. Описанный новый тип и механизм перемещения гамет **ранее не был известен не только у диатомовых, но и у всех других эукариот в целом**. Весь процесс зафиксирован видеосъемкой и хронометрически выверен, а это значительно повышает достоверность факта.

Распределение полов и система скрещивания, тесно связанные с типами полового процесса диатомей, обсуждаются в **разделе 8**. Центрические диатомовые являются генетически однодомными, и проявление пола у них определяется эпигенетически, т. е. один и тот же клон может продуцировать как мужские, так и женские гаметы. Пеннатные диатомеи являются генетически двудомными, половое воспроизведение у них обычно происходит при скрещивании клонов противоположного пола. Как показало исследование Н.А. Давидовича, в популяциях изученных им видов количество мужских и женских организмов приблизительно одинаково, что предполагает диплогенетический характер определения пола. В экспериментах по изучению пола потомства, появившегося в результате внутриклонового воспроизведения анизогамных видов убедительно продемонстрировано, что женский пол является гомогаметным, а мужской – гетерогаметным. Половые детерминанты расположены, очевидно, в разных хромосомах, представлены одним локусом и наследуются независимо.

Раздел 9 посвящен вопросу наследования, связанного с полом, одному из интереснейших в репродуктивной биологии. Ранее установлено, что наследование внеядерной митохондриальной ДНК и митохондрий у большинства многоклеточных организмов, включая человека, происходит по материнской линии, но этот вопрос не был изучен у диатомей. Впервые исследование наследования митохондриального гена цитохромоксидазы было проведено автором и его коллегами (Gastineau *et al.*, 2013) на примере скрещивания репродуктивно совместимых клонов из двух популяций раздельнополого пеннатного вида *Haslea ostrearia*, обитающих на

французском и норвежском прибрежье Атлантики. Потомки от скрещивания этих клонов наследовали митохондриальный ген **от родителя только одного пола**, независимо из какой популяции происходил клон этого пола. Эта работа оказалась первой и пока единственной, которая описывает **унипарентальный** способ наследования митохондрий у раздельнополых диатомовых. Установить пол, ответственный за унипарентальную передачу митохондриальной ДНК у *Haslea ostrearia*, затруднительно даже на этапе гаметогенеза из-за полной изогамии, характерной для рода *Haslea*. Логичным кажется предположение автора, что за передачу митохондриальной ДНК у *H. ostrearia* все же ответственны клоны женского типа (гомогаметные), учитывая способность клонов только одного типа скрещивания к внутриклоновому воспроизведению. Для получения более надежных доказательства половой принадлежности клонов, участвующих в унипарентальном наследовании, необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

Репродуктивная изоляция как критерий вида у диатомовых рассматривается в **разделе 10** и затрагивает самую насущную проблему диатомологии корректную идентификацию видов и построение естественной филогенетической системы. При существовании в современной литературе множества концепций вида и способов разграничения видов, сформулированная Э. Майром (1968, 1974) биологическая концепция вида определяет ключевым и объективным критерием для разграничения видов – репродуктивной изоляцией. Закрепленная генетической программой и выраженная в неспособности скрещиваться или нежизнеспособности потомства репродуктивная изоляция обуславливает эволюционную дивергенцию видов.

В данном разделе Н.А. Давидович показал, каким образом этот критерий репродуктивной изоляции/совместимости может быть применен на практике относительно диатомей, проведя многочисленные эксперименты по скрещиванию клонов. Эксперименты доказали, что применение критерия

позволяет выявить межвидовые границы, в том числе между симпатрическими видами, даже если их различие на морфологическом уровне не столь очевидно. Это особенно важно для разграничения так называемых криптических видов, видов-двойников; актуально в случае сильно вариабельных видов, когда необходимо принять решение, представляет ли собой конкретная морфологическая вариация вариетет внутри вида или самостоятельный вид; для доказательства того, что существенные морфологические и генетические различия между двумя морфотипами являются внутривидовым варьированием. В разделе приведены также примеры экспериментов с клонами, выделенными из природной популяции и считавшимися как один вид, но в ходе исследований оказывались репродуктивно несовместимыми, а это в свою очередь приводило к заключению о существовании в пробах близкородственных криптических видов или даже видов, ранее не описанных и новых для науки. Приведены также примеры существования популяций, удаленных друг от друга на значительное расстояние, оказывающихся репродуктивно совместимыми, что подтверждает их конспецифичность.

Содержание **раздела 11** (Репродуктивные границы и биогеография диатомовых) логично вытекает из предыдущего раздела и посвящен давно дискутируемым проблемам биогеографических исследований диатомовых, а именно: являются ли диатомовые космополитами или они распределяются локально; что из себя представляют видовые комплексы; существуют ли пространственные границы между близкородственными видами и др. Биологическая концепция вида, рассмотренная в предыдущем разделе, определяет виды не только как совокупности репродуктивно совместимых организмов, оставляющих плодовитое потомство в поколениях, но и устанавливает границы между видами, выраженные в репродуктивной изоляции видов. Следуя этой концепции вида, Н.А. Давидович на примере экспериментов попарного скрещивания клонов из девяти, удаленных на значительные расстояния друг от друга популяций широко распространенной

на Евразийском континенте диатомеи *Ulnaria ulna*, убедительно доказал существование биологического барьера между западной и восточной группами популяций. Этот барьер лимитирует или вовсе исключает возможность переноса генетического материала двух репродуктивно изолированных групп, которые в настоящее время следует считать самостоятельными видами. Таким образом, возникновение репродуктивной изоляции служит хорошим критерием для делимитации видов, поскольку критерий репродуктивной совместимости/изоляции затрагивает сущность самого процесса видообразования, иными словами, с момента возникновения биологического барьера начинается самостоятельная эволюционная (филогенетическая) история вида.

В то же время в диссертации показано существование репродуктивной совместимости географически удаленных популяций на примере морских и пресноводных видов, что не отрицает локального эндемизма других видов и даже родов.

В целом, критерий репродуктивной совместимости/изоляции не противоречит филогенетической, эволюционной, морфологической и другим концепциям, позволяет обнаружить и доказать факт дивергенции видов и избежать чрезмерного дробления видов, характерного для филогенетических построений.

В заключительном **12-ом разделе** всесторонне анализируются возможности и проблемы построения естественной филогенетической системы диатомовых водорослей. Современная систематика диатомовых представляет собой в основном морфологическую систематику, далёкую от естественной филогенетической системы. Создание последней требует поиска новых подходов. Одним из таких подходов может быть молекулярно-генетический, особенно при рассмотрении филогенетических позиций высоких рангов — на уровне семейств и выше. Однако, этот подход не однозначен при изучении межвидовых границ в пределах одного рода, особенно если расхождение видов произошло недавно, или же

возникновение видовой обособленности не сопровождалось существенными генетическими, а также морфологическими, физиологическими и другими расхождениями. Хорошим критерием, разрешающим эту проблему, может служить репродуктивная несовместимость, в то время как репродуктивная совместимость доказывает видовое единство и реализуется в ходе полового процесса.

Тип полового процесса, как было показано автором диссертации, является отличительной и консервативной родовой характеристикой и может быть связан с разными путями воспроизведения, а именно, гомоталлическим и гетероталлическим. Расхождение в типах полового процесса, подразумевает половую несовместимость, поэтому обнаружение существенной разницы в типах полового процесса дает основания для разделения таксономических единиц разного ранга, начиная от видового и заканчивая уровнем класса. Совершенно логичен при этом вывод автора, что **использование типа полового процесса вместе с морфологическим и генетическим подходами необходимо для построения естественной системы диатомовых водорослей**, подтверждая этот вывод рядом примеров из литературных источников. Наиболее ярким примером из них является исследование генетических изменений токсариид, у которых произошла утрата жгутиковых сперматозоидов, изменился способ детерминации пола и произошел переход от гомоталлизма к гетероталлизму. В конечном итоге это исследование привело к пониманию того, что изучение репродуктивной биологии диатомовых помогает понять не только филогенетические отношения между таксонами, но и вопросы, касающиеся эволюции диатомей и эволюции пола у эукариот в целом.

В **Заключении** диссертации Н.А. Давидович подвел краткий итог проведенных им исследований и анализа публикаций, позволяющий структурировать область знаний, определяемую как репродуктивная биология диатомовых, обозначив отдельные, более узкие направления исследований, соответствующие основным разделам диссертации, и выделив

круг задач и перспективы дальнейших исследований, связанных с решением фундаментальных и прикладных вопросов.

Завешают диссертационную работу **12 выводов**, полностью отвечающих поставленным задачам и выносимым на защиту положениям. Выводы четко и лаконично сформулированы и отображают ключевые моменты содержания диссертации.

К несомненному достоинству диссертации следует отнести словарь терминов и их синонимов, который значительно облегчает прочтение работы даже неспециалистам в данной области исследований.

Заключение

Диссертационная работа Н.А. Давидовича представляет обширное фундаментальное и обобщающее монографическое произведение, выполненное на высоком научном уровне на основании собственных многочисленных экспериментальных исследований и критическом анализе литературных источников. По сути, диссертация является обоснованием особого направления общебиологических исследований репродуктивной биологии организмов, которая должна решать проблемы, касающиеся разных уровней организации живой материи: молекулярного, клеточного, популяционного и видового. Развитие этого нового направления представляется очень важным для формирования единой, общей концепции понятия вида (и не только у диатомовых водорослей), которая должна базироваться на применении комплексного подхода, объединяющего использование нескольких критериев: морфологического, генетического и репродуктивного.

Работа свидетельствует о широкой эрудиции автора, глубоком осмыслении не только своего материала, но и всей литературы в данной области исследований. Написанная хорошим научным языком и прекрасно проиллюстрированная работа, должна быть опубликована в полном объеме. Она, несомненно, будет востребована специалистами, занимающимися таксономией, систематикой, биогеографией, филогенией, эволюцией

диатомовых и их практическим биотехнологическим использованием. Опубликованная работа также может служить учебным руководством для молодых поколений диатомологов, особенно по части постановки экспериментов и культивированию водорослей.

Основные положения диссертации отражены в 95 публикациях, в том числе в высокорейтинговых международных журналах. Материалы диссертации апробированы на многочисленных форумах (международных конгрессах, симпозиумах, конференциях). Все это говорит о признании Н.А. Давидовича одним из ведущих специалистов-диатомологов мирового уровня. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Небольшие замечания к текстам диссертации и автореферата, касаются всего нескольких опечаток, технически легко исправимым.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Н.А. Давидовича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.01 – «Ботаника» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Давидович Николай Александрович** заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.01 – «Ботаника».

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник

лаборатории экологии аридных территорий
ФГБУН «Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН»
ДОРОФЕЮК Надежда Ивановна

06.12.2019

Контактные данные:
Тел.: , e-mail:
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.16 – «Экология»

Адрес места работы:
119071, г. Москва, ул. Ленинский проспект, д. 33,
ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН»,
лаборатория экологии аридных территорий.
Тел.: 8(499)1247934, e-mail: monexp@ mail.ru