

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Усмановой Регины Рустамовны

**«Размножение и развитие спороцист *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835
(Trematoda: Leucochloridiidae)»,**

представленную на соискание степени кандидата биологических наук

по специальности **1.5.12 – Зоология**

в диссертационный совет **24.1.119.01 (Д 003.033.01)** на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук»

Актуальность, фундаментальная значимость и новизна.

Диссертационное исследование Усмановой Регины Рустамовны посвящено детальному изучению вопросов развития партенит трематод рода *Leucochloridium*, особенностям реализации их жизненного цикла и механизма заражения моллюска-хозяина.

Наличие у спороцист р. *Leucochloridium* крупных отростков, имеющих специфическую форму и окраску, позволяет использовать такую особенность в целях видовой идентификации трематод этого рода. Вместе с тем, несмотря на значительное разнообразие формы, размеров и окраски отростков, до сих пор отсутствуют сведения о внутривидовой генотипической и фенотипической изменчивости спороцист. Остаётся неясным, могут ли спороцисты с разными вариантами окраски отростков относиться к одному виду или, наоборот, и спороцисты с одинаково окрашенными отростками относиться к разным видам. Для выяснения этих вопросов в качестве модельного объекта были использованы наиболее распространённые на территории европейской части России и Белоруссии трематоды *L. paradoxum*, на примере которых, на основе изучения морфологических признаков и молекулярно-генетических маркеров, были проведены работы по определению их точной видовой идентификации и анализу внутривидовой изменчивости.

Промежуточным хозяином трематод *L. paradoxum* являются моллюски *Succinea putris* из сем. Succineidae. Для гастропод этого семейства характерен широкий внутривидовой полиморфизм, что приводит к тому, что моллюски из разных родов могут быть схожи по морфологии раковин. С учётом высокой специфичности трематод к первому промежуточному хозяину, такой полиморфизм может приводить к ошибкам при установлении видового соответствия в системе партениты-моллюск. Потому, для изучения развития и размножения спороцист из природно заражённых моллюсков, а также для проведения экспериментов, как и в случае с партенитами, потребовалась предварительная точная видовая идентификация промежуточного хозяина путём анализа его морфологических при-

знаков и молекулярно-генетических маркеров.

С учётом изложенного выше, тема исследования, несомненно, является актуальной.

Научная новизна работы заключается в комплексности исследования паразито-хозяйинной системы «трематоды *Leucochloridium paradoxum* - моллюски *Succinea putris*». Для этого впервые было проведено генотипирование гастропод *S. putris* из разных популяций, и спороцист *L. paradoxum*, паразитирующих в них. Выполнен дизайн праймеров для участка митохондриальной ДНК *S. putris*. Впервые проведён анализ внутривидовой изменчивости окраски спороцист *L. paradoxum*.

Подробно исследован жизненный цикл *L. paradoxum*. Новым для науки стало детальное изучение внутримоллюскового развития *L. paradoxum*, результаты которого доказали отсутствие паразитической фазы развития материнской спороцисты.

На основании полученных данных о развитии партенит, анализа биологии их definitivo- и промежуточных хозяев представлена схема реализации жизненного цикла трематод *L. paradoxum* в условиях средних широт.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что представители сем. Leucochloridiidae относятся к группе трематод, которые, обладая двуххозяиным циклом, утратили фазу свободноживущих церкарий. В связи с этим сведения о природе партенит р. *Leucochloridium* важны для понимания эволюции дигеней в целом.

Полученные результаты о механизме размножения дочерней спороцисты *L. paradoxum* подтверждают универсальность герминальной массы (ГМ) как органа размножения партенит трематод.

Практическая значимость работы заключается в том, что морфологические и молекулярно-генетические признаки трематод р. *Leucochloridium* и моллюсков *S. putris* позволяют проводить их видовую идентификацию в фаунистических и систематических исследованиях.

Представленная в работе схема реализации жизненного цикла представляет интерес для зоологов, паразитологов и экологов. Полученные сведения важны для разработки методов анализа гельминтофауны птиц - окончательных хозяев трематод р. *Leucochloridium* и профилактики их гельминтозов.

Разработанная методика поддержания жизненного цикла *L. paradoxum* в лабораторных условиях имеет значение для расшифровки жизненных циклов других трематод, использующих в качестве промежуточных хозяев наземных брюхоногих моллюсков.

Диссертация изложена на 107 страницах, включает 11 таблиц и 36 рисунков. Составляет из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 176 источников, 121 из которых на иностранных языках.

Глава первая представляет собой литературный обзор работ предшественников и коллег диссертантки. В обзоре достаточно подробно рассмотрены история исследований трематод рода *Leucochloridium*, сведения о жизненном цикле, промежуточных хозяевах и систематике этих сосальщиков, а так же вопросы, связанные с молекулярно-генетическими исследованиями трематод этого рода. Литературный обзор охватывает период с начала XIX века по настоящее время, является всеобъемлющим и даёт полное представление об исследованиях, проведённых до начала выполнения работы соискательницей.

Во второй главе приводится методическая часть работы. В главе подробно описаны места, способы сбора и содержания моллюсков. Описана методика постановки жизненного цикла трематод *L. paradoxum* в лабораторных условиях. Детально описаны методы гистологических и молекулярно-генетических исследований. Все методы описаны достаточно полно и позволяют получить результаты, соответствующие поставленным задачам.

Глава 3 посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению. В ней приведены результаты видовой идентификации моллюсков *S. putris* и спороцист *L. paradoxum* с использованием, как морфологических признаков, так и митохондриальных генетических маркеров. В обсуждении сравниваются оба метода, и обосновывается необходимость их совместного применения для более точной видовой диагностики исследуемых объектов.

Особо стоит отметить раздел посвящённый результатам наблюдений за развитием и размножением спороцист *L. paradoxum*, как в условиях лабораторных экспериментов, так и натурных исследований. Обращает внимание отличная доказательная база, основанная на качественном иллюстративном материале с использованием как световой, так и конфокальной микроскопии.

В целом, рукопись производит благоприятное впечатление. Тем не менее, при прочтении возникают некоторые вопросы и замечания.

Вопросы:

1. Одним из центральных выводов работы стало утверждение о том, что разветвлённые спороцисты относятся к дочернему поколению. При этом, паразитическая фаза материнской спороцисты отсутствует. Хотелось бы услышать более чёткое обоснование позиции автора с учётом того, что первые срезы спороцисты получены только через 7 дней после заражения.
2. Когда формируются идентифицируемые признаки метацеркарий? Существует ли внутри спороцисты свободная стадия церкарии, которая затем подвергается очевидному образованию цисты? Другими словами, подавляется ли в жизненном цикле стадия церкарий вообще?

3. Почему для описания реализации жизненного цикла в природе используется термин «когорта», а не распространённое определение «генерация»/«поколение»?
4. В работе не приводятся данные о количестве герминальных масс. Сколько их у спороцист разного возраста? Увеличивается ли их число с ростом и развитием спороцисты?
5. Отмечаются случаи множественной инвазии. Они являются следствием заражения несколькими мерицидиями? Или развитием не одной, а двух генеративных клеток?
6. В работе указывается, что если спороцисты при множественном заражении находятся на разных стадиях развития, это является свидетельством повторного заражения. Не может ли быть связана разница в скорости развития с влиянием спороцист друг на друга (наиболее крупная подавляет в развитии мелких)?
7. В работе приводятся данные о характере окраске отростков, однако, они не соотносятся с данными, полученными в результате исследования с использованием генетических маркеров. Соответствуют ли варианты окраски определённым гаплотипам? Есть ли связь характера окраски и места сбора или же времени сбора?
8. Почему для генотипирования по фрагменту митохондриального гена цитохром с-оксидазы не использовали праймер из статьи Bowles и McManus (Bowles et al., 1993)?

Замечания:

1. В работе приведена филогенетическая реконструкция по фрагменту гена *cox1* с использованием гаплотипов. Хотелось бы видеть в работе также и дерево, построенное с использованием последовательностей с учётом мест сбора образцов.
2. Не было проведено исследование динамики популяции моллюсков - промежуточных хозяев. Приводимая схема реализации жизненного цикла *L. paradoxum* в условиях средних широт, таким образом, не подкреплена данными о биологии хозяев, обитающих в соответствующем регионе.
3. Не приведена полноразмерная фотография радулы *S. putris*.
4. Имеются технические ошибки. В названии главы II.4 пропущено слово «исследование».

Высказанные замечания никак не влияют на оценку сущности работы. Диссертационная работа Усмановой Регины Рустамовны представляет собой самостоятельное законченное квалификационное научное исследование. Актуальность избранной темы не вызывает сомнения. Научные положения обоснованы. Научная новизна чётко прописана и ясно определена в сравнении с имеющимися в литературе данными. Цели и задачи работы соответствуют друг другу и обеспечивают получение новых результатов. Личный вклад соискателя и достоверность исследования, не подвергается сомнению.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Выводы хорошо аргументированы и не вызывают возражений. Основные результаты, неоднократно доложенные на конференциях, в том числе с международным участием.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах из списка ВАК, и 12 материалов и тезисов конференций.

Заключение

Диссертационная работа Усмановой Регины Рустамовны «Размножение и развитие спороцист *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 (Trematoda: Leucochloridiidae)» является самостоятельным исследованием, которое по актуальности, объёму, новизне и значимости полученных результатов соответствует пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с учётом изменений, внесённых постановлением Правительства РФ «О внесении изменений в Положение о присуждении учёных степеней» от 21.04.2016 г. № 335. Автор исследования заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – Зоология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук (03.00.19 - Паразитология),
кандидат биологических наук (03.00.08 - Зоология),
профессор, заведующий кафедрой общей биологии и биомедицины,
ФГБОУ ВО «Псковский государственный университет»
180000, г. Псков, пл. Ленина, дом 2.
Тел.: +7(8112) 201-699
Факс: +7(8112) 201-699
E-mail: rector@pskgu.ru
Адрес www-сервера: http://pskgu.ru

Прокофьев Владимир Викторович

30.10.2023 г.

kafzoeco@pskgu.ru

+7(8112) 201-699 (доп. 512)

