

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію Леонтьєва Дмитра Вікторовича
«Міксоміцети родини Reticulariaceae: молекулярна філогенія, морфологія і систематика»
представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація Д.В. Леонтьєва є повною завершеною критичною ревізією родини Reticulariaceae, яка проведена із залученням методів молекулярної генетики, філогенетичного аналізу, порівняльної морфології, морфометрії, скануючої електронної мікроскопії та статистичного аналізу, на основі 1377 зразків міксоміцетів, зібраних на п'яти континентах Земної кулі.

Актуальність теми обумовлена відсутністю сучасної ієрархічної системи міксоміцетів, яка б включала молекулярно-філогенетичні дані. Класична їх класифікація є вкрай консервативною і базується на системах, запропонованих ще Т. Макбрайдом та Ф. Шевальє наприкінці XIX - початку XX століття. Традиційну структуру кінця XIX століття мають і представники родини Reticulariaceae, що включають три роди *Lycogala* Adans., *Reticularia* Bull. та *Tubifera*. Сформована автором гіпотеза поліфілії еталіальних та псевдоеталіальних таксонів міксоміцетів, дозволить молекулярними методами перевірити усталені таксономічні ознаки родини Reticulariaceae та запропонувати сучасну філогенетичну систему міксоміцетів.

Дисертація Д.В. Леонтьєва є **оригінальним** науковим дослідженням, що базується на комплексному аналізі первинної структури 5'-домени 18S рДНК та морфологічних ознак міксоміцетів родини Reticulariaceae для побудови філогенетичної системи і удосконалення принципів ідентифікації цих організмів. Робота є першим спеціалізованим дослідженням філогенезу міксоміцетів родини Reticulariaceae, здійсненим із залученням молекулярно-генетичних методів.

Науковою новизною проведеного дослідження є встановлення надійності використання відносно короткої ділянки 18S рДНК як молекулярного штрих-коду для ідентифікації міксоміцетів родини Reticulariaceae і з'ясування філогенетичних зв'язків між ними. Вперше описані ділянки 18S рДНК, що у межах Reticulariaceae є специфічними на рівні роду і можуть бути використані для розмежування таксонів родини. Вперше для міксоміцетів виявлений молекулярний баркод-геп, який дозволив окреслити генетично обґрунтовані межі між видами та підвидами міксоміцетів. На підставі морфологічних, ультраструктурних та молекулярно-генетичних даних у межах родини Reticulariaceae описано 11 нових для науки видів, а також 2 нових для науки підвиди. Запропоновано два нових для науки роди міксоміцетів: *Rigidotubula* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson і

Tecotubifera Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson. Вперше, з використанням молекулярно-генетичних даних, обґрунтована відокремленість від родини Reticulariaceae видів роду *Reticularia*, що мають бородавчасті спори, забарвлені у оливковий, золотисто-жовтий або бурий колір. Вперше для міксоміцетів родини Reticulariaceae проведено філогеографічне дослідження, яке спростувало уявлення про космополітизм цих організмів і показало властиве їм різноманіття ареалів. Вперше вдалося встановити існування у світлоспорових міксоміцетів диз'юнкцій ареалу, вузького ендемізму і вікаризму, а також довести, що види, які мають великі ареали, розділяються на географічні раси, причому останнім відповідають споріднені 18S-генотипи.

Вперше розроблено ієрархічну систему епіморфем міксоміцетів родини Reticulariaceae, що дозволило виділити 14 архетипів. Вперше проведено співставлення відомостей про морфологічне різноманіття міксоміцетів родини Reticulariaceae (головним чином архетипів) з даними про їхній філогенез, на підставі чого описані закономірності еволюційних перетворень у структурі спорофорів цих організмів. Запропоновано гіпотези про роль паралельної еволюції та конвергенції у розвитку еталіальних та псевдоеталіальних форм у складі родини.

Розроблено першу філогенетичну систему міксоміцетів, структура якої відображає відношення спорідненості між таксонами, а самі таксони характеризуються комплексом морфологічних ознак.

У першому розділі дисертації «Критичний огляд систем міксоміцетів та місце в них родини Reticulariaceae» автор розгорнуто викладає історію дослідження міксоміцетів та зокрема родини Reticulariaceae. Огляд відомих літературних джерел доводить, що існуюча система родини не відображає філогенетичних зв'язків у межах групи і не систематизує належним чином існуюче у ній різноманіття.

Розділ «Молекулярні маркери у філогенетичних дослідженнях міксоміцетів» є логічним продовженням першого розділу. В ньому детально обговорюються особливості будови маркерних ділянок геному міксоміцетів, а також перспективи використання того чи іншого молекулярного маркеру для філогенетичних досліджень. Доведено, що оптимальним маркером спорідненості між таксонами є 5'-домен 18S рДНК.

Розділ «Матеріали та методи досліджень» дає повне враження щодо вихідних фактичних даних. Основою для досліджень стали 402 зразки міксоміцетів, зібраних власне автором роботи, а також матеріали, які були надані у тимчасове користування з 17 державних та приватних гербаріїв світу. Досліджені зразки походять з 33 країн світу та п'яти континентів, що свідчить про світовий рівень монографічної обробки родини Reticulariaceae. Загальна кількість досліджених зразків складає 1377 одиниць зберігання,

що також є підтвердженням повноти таксономічної обробки. Автором самостійно була проведена екстракція тотальної геномної ДНК міксоміцетів та ампліфікація 5`-домен 18S рДНК. В цілому було отримано 169 ампліконів, які було вдало секвеновано дидезоксинуклеотидфосфатним методом Сенгера. Отримані послідовності оброблялися з використанням загально прийнятих методик щодо філогенетичного аналізу. Особливо вдалим слід вважати застосування алгоритму MAFFT для співставлення послідовностей. Слід також відмітити, що автор самостійно оволодів методами електронної мікроскопії, використовуючи ці дані для детального дослідження морфології міксоміцетів.

Результати досліджень власне починаються з розділу «Генетичне різноманіття міксоміцетів родини Reticulariaceae та філогенетичні зв'язки між ними». У результаті проведеного дослідження було отримано 169 нуклеотидних послідовностей 5`-домени 18S рДНК міксоміцетів, серед яких 60 виявилися новими для науки. Заслуговує уваги визначення генетичної дистанції між усіма можливими парами одержаних послідовностей. Автором інтерпретований розрив у ряді значень p , розташований у діапазоні 0,11-0,15, як природна межа між внутрішньовидовим та видовим рівнями генетичної мінливості таксонів. Проведена Д. В. Леонтьєвим реконструкція філогенетичних зв'язків між міксоміцетами родини Reticulariaceae показала, що усі залучені до аналізу представники родини, окрім двох винятків, утворили монофілетичну кладу з максимальним рівнем статистичної підтримки. Два види роду *Reticularia* Bull., *R. olivacea* (Ehrenb.) Fr. та *R. liceoides* (Lister) Nann.-Bremek. увійшли до складу іншої кледи, яка відповідає родині Cribariaceae. Роботу добре ілюструє діаграма філогенетичних зв'язків, де в чітко показано наявність шести монофілетичних клад, які утворюють роди *Tubifera*, *Rigidotubula*, *Alwisia*, *Reticularia*, *Thecotubifera*, *Lycogala* в родині Reticulariaceae, та кладу з *Reticularia olivacea* (Ehrenb.) Fr. та *R. liceoides* (Lister) Nann.-Bremek., що займають відокремлену позицію. Одержані дані підтвердили самостійність усіх досліджених видів родини Reticulariaceae.

Автором обґрунтовано спростована ЕіЕ-гіпотеза, яка традиційно була основою уявлення про космополітичне поширення міксоміцетів. Переважна більшість досліджених таксонів трапляється південніше, або, навпаки, північніше умовної лінії, яка проходить між 30 та 40 паралелями північної широти. Крім того, накладання на карту поширення генотипів поширення окремих видів родини Reticulariaceae показало, що генетичні дистанції між генотипами співпадають з географічними відстанями між їхніми ареалами. Виходячи з цього, автор формулює висновок, що ареал кожного генотипу складався протягом геологічно довгого часу і не здатен до швидких змін навіть за умови відсутності виразних географічних бар'єрів.

Розділ «Таксономічна ревізія родини Reticulariaceae» побудований у класичному таксономічному стилі, де до кожного таксону видового рівня подається повна номенклатурна цитата, синоніми, типовий матеріал, іконографія, депозити в MycoBank та GenoBank, уточнений український або новий діагноз, екологічні особливості та поширення, досліджені зразки та примітки. Автором проаналізовано та проілюстровано 15 таксонів видового рівня та один внутрішньовидовий таксон, які власне і складають об'єм родини Reticulariaceae, а також два види, які є представниками родини Cribrariaceae. Вражає висока таксономічна новизна: 11 видів (34% від загального обсягу родини) та 2 роди (25% від загального обсягу родів родини Reticulariaceae) були відкриті Д.В. Леонтєвим з співавторами вперше. Прикрашає розділ 18 рисунків, які показують основні діагностичні ознаки таксонів, включаючи авторські ілюстрації, зроблені за допомогою СЕМ.

В розділі «Морфологія міксоміцетів родини Reticulariaceae» показано різноманітність морфологічних ознак групи. Детально проаналізована морфологія спорофорів, споротек, ніжки, перидію, капіліцію, колюмели, спор, плазмодія та недозрілих спорофорів. Автором доведено, що морфологічне різноманіття родини набагато ширше, ніж було до початку дослідження. Деякі морфологічні ознаки раніше не помічалися, або їм не надавали належної уваги. Зокрема, запропоновано використовувати таку таксономічну ознаку, як колір недозрілих спорофорів у якості діагностичних ознак, наприклад при розпізнаванні півдвидів *Tubifera ferruginosa*. Також, Д.В. Леонтєв запропонував термін «іридизація» або «іридизуюча здатність», довів зв'язок іридизації із будовою зовнішніх структур перидію та показав її таксономічну значущість для розділення таксонів родини *Reticulariaceae*.

Розділ «Епіморфологія міксоміцетів родини Reticulariaceae» починається з дискусії щодо протиставлення філеми та епіморфеми. Автором впорядковані відомості щодо ознак досліджуваних організмів у вигляді системи меронів, що представлені мерономічними родами та мерономічними видами. Аналіз меронів дозволив автору створити оригінальну ієрархічну структуру епіморфеми, що добре ілюструє ідею редукції кількості дискримінантних ознак шляхом виключення внутрішньо суперечливих і просто неіснуючих комбінацій. Побудова ієрархії епіморфем дозволили Д.В. Леонтєву створити 14 архетипів для епіморфологічних таксонів. Накладання філогенетичних зв'язків на архетипи міксоміцетів дозволили встановити послідовність еволюційних подій, які привели до сучасного морфологічного різноманіття родини Reticulariaceae. Еволюційні події дуже вдало ілюструє рис. 7.5, де також показано, що морфологічні ознаки

останнього спільного предка максимально наближені до *Alwisia lloydiae*, який нещодавно відкритий автором з колегами на південному сході Австралії та Тасманії.

Принципово нова система міксоміцетів представлена автором в розділі «Систематична структура та принципи ідентифікації окремих груп організмів». Запропонована Д.В. Леонтьєвим філогенетична система є результатом компромісу між багатоступінчастою структурою кладограм та обмеженою кількістю рівнів таксономічної ієрархії. Автором встановлено нові для науки надпорядки Echinostelianaе, Stemonitianaе, Cribrarianaе, Trichianaе, порядки Reticulariales, Lamrodermatales та Meridermatales, родини Lamprodermataceae, Meridermataceae та Commatrichaceae. У новому розумінні використано назви Cribrariales, Liceales, Stemonitales, Trichiales, Stemonitidaceae, Duanemataceae, *Physarum* та *Trichia*. Особливо важливим в роботі є вдала спроба створення таблиць для визначення таксонів міксоміцетів: від класів до видів. В таблицях відображені діагностичні морфологічні ознаки, які узгоджуються з отриманими філогенетичними даними.

Високо оцінюючі проведену дисертантом роботу в цілому, дозволю зробити деякі зауваження та винести на обговорення низку дискусійних питань.

- 1) Розділ «Матеріали та методи» виписаний досить логічно з детальним описом усіх етапів, методик та процедур. Однак, в деяких випадках опис методів переходить у площину підручників з молекулярної біології. Наприклад (стор. 98): «Цей метод (мається на увазі ампліфікація ДНК) ґрунтується на багатократному копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою термостабільної ДНК-полімерази та штучно синтезованих праймерів, комплементарним обом кінцям цієї ділянки. Отже, для проведення ПЛР потрібні такі компоненти...» і далі перераховуються усі компоненти на півсторінки. Для опису методики секвенування ДНК достатньо було б вказати тип секвенатора та послатися на відповідні літературні джерела. Однак, на сторінці 104-й йдеться про детальний опис роботи сучасного секвенатора. Хоча ці деталі зайві, на мій погляд, у дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, однак, були б доречними у написання відповідної сучасної монографії для студентів, аспірантів та молодих дослідників.
- 2) Автор стверджує, що «...у видів дослідженої родини спостерігаються принаймні чотири типи ареалів: ендемічний, голарктичний, екваторіально-антарктичний та космополітний» (висновок 4). Треба зауважити, що коректнішим формулювання висновку буде «...у видів дослідженої родини спостерігаються ареали принаймні чотирьох типів: ендемічний, голарктичний, екваторіально-антарктичний та космополітний». Крім того, не виправдано відносити до космополітного типу ареали

групи видів, які не зустрічаються в Антарктиді. Скоріше всього, такі види мають ареали гемікосмополітного типу.

- 3) Автором доповнено діагноз виду *Tubifera ferruginosa* (Batsch) J.F. Gmel., Syst. Nat. 2: 1472 (1792) s. str. emend Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson, Mycologia 107 (5): 963 (2015). У зв'язку з втратою голотипу запропонований лектотип (Batch, icon. 175b (1786)) та виділений епітип (GFW22067). В подальшому обговорюється виділення двох підвидів виду, зокрема subsp. *ferruginosa* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson, subsp. nov., 107 (5): 965 (2015). Останній базується на тому ж самому зразку епітипу (GFW22067), який названий автотипом. На мій погляд, це зайве таксономічне переобтяження. Достатньо було при доповненні опису *Tubifera ferruginea* (Batsch) J.F. Gmel. відразу доповнити опис номінативного підвиду та провести відповідну типіфікацію. При цитуванні 9 номерів з GenBank, можна було б вказати, який саме відповідає епітипу. Крім того, на рис. 5.1 в.г. показані гарні ілюстрації таксону, які зроблені з голотипу (GFW22067). Насправді голотипу немає, а зразок (GFW22067) відноситься до епітипу.
- 4) Опрацювання автором матеріалу щодо роду *Tubifera* дозволило виявити ряд ознак, які раніше не вважалися характерними для нього. Серед них забарвлення недозрілих спорофорів: помаранчевий, лососевий, бежевий. Однак, при описі виду *Tubifera corymbosa* Leontyev, Schnittler, S.L. Stephenson et L.W. Walker, ця ознака взагалі не обговорюється. Якщо неможливо було дослідити зміни кольорів молодих спорофорів (в гербарії представлені лише дозрілі спорофори), то, принаймні, треба було б у діагнозі виду на це вказати.
- 5) Автором стверджується, що ним описано 2 нових для науки роди *Thecotubifera* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson gen. nov. nom. prov. та *Rigidotubula* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson gen. nov. prov., а також *Rigidotubula violacea* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson sp. nov. nom. prov., *R. reticulata* Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson sp. nov. nom. prov. Більш точним було б наступне формулювання: підготовлені до опису протологи нових для науки родів та видів та провізорні назви. Теж саме стосується і нових комбінацій *Thecotubifera dictyoderma* (Nann.-Bremek. Et Loer.) Leontyev, Schnittler et S.L. Stephenson sp. nov. nom. prov., *Lindbladia liceoides* (Lister) Leontyev comb. nov., nom. prov.
- 6) При дослідженні морфологічних ознак представників родини Reticulaceae була відновлена таксономічна комбінація *Siphoptychium casparyi* Rostaf. Однак, відомості щодо типових зразків відсутні. У даному випадку автор міг виділити лектотип, базуючись на іконографії протологу (Rostafinski, Sluzowce monogr. suppl. 32, 1876, fig.

245), або з досліджених зразків виділити неотип. Тим більше, що в роботі досить добре проілюстрований зразок UARK 4223 з Японії, який міг би стати неотипом *Siphoptychium casparyi* Rostaf.

- 7) Номенклатура епіморфологічних таксонів базується на аглютинативну способі словотворення. В результаті маємо назви епіморфем, що складаються з трьох (наприклад трихостилокарпон) та навіть чотирьох (наприклад силодиморфоламінокластом) коренів. Дійсно, в українській термінології основокладання є одним з найважливіших продуктивних способів термінотворення. Однак, як відомо, між словником науки та словником побуту існує прямий тісний зв'язок, тому терміни, які складаються з трьох і більше основ, важко сприймаються, запам'ятовуються та саме головне, вживаються наступним поколінням вчених.
- 8) До дискусії спонукає і номенклатура нової системи міксоміцетів. Треба відмітити, що слизовики підпадають як під Міжнародний кодекс ботанічної номенклатури (7 преамбула), так і під кодекс зоологічної номенклатури (ст. 1.1.1). Якщо розглядати міксоміцети за кодексом зоологічної номенклатури, то маємо клас Мухог**astrea**, порядки Lice**ida**, Trich**ida**, Stemonit**ida** та ін., родини Trichi**idae**, Stemonit**idae**, Comatr**ichidae** та ін. За кодексом ботанічної номенклатури: клас Мухом**ycetes**, порядки Lice**ales**, Trich**iales**, Stemonit**ales** та ін., родини Trichi**aceae**, Stemonit**idaceae**, Comatr**ichaceae** та ін. Чому в запропонованій системі назви відділу та класу відповідають кодексу зоологічній номенклатури, а порядку та родини – ботанічній? Ґрунтовного пояснення потребує авторська ліквідація порядку Physarales.
- 9) У деяких висновках спостерігаються зайві визначення понять: наприклад, висновок 7 «... можна виділити маркери філогенезу – видоспецифічні ознаки, селективне значення яких є відносно низьким, а ймовірність повторного виникнення під тиском добору – достатньо малою»; висновок 9 «Систематизація цих архетипів дозволила вперше для досліджуваної групи розробити епіморфему – ієрархічну систему життєвих форм (стиломорф)».

Таким чином, наукові положення та **висновки** дисертації **достовірні**, обґрунтовані великим обсягом зібраного та обробленого матеріалу та критичним аналізом отриманих даних. Оцінюючі дисертаційну роботу у цілому, слід підкреслити, що вона є оригінальним монографічним зведенням щодо родини Reticulariaceae і може розглядатися як цінний внесок Дмитра Вікторовича Леонтьєва у дослідження біорізноманіття планети.

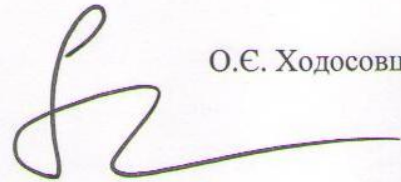
Автореферат повністю відповідає тексту дисертації.

Матеріали дисертації практично повністю викладені в 55 наукових роботах автора (12 у фахових журналах англійською мовою), та представлені на 5 міжнародних конгресах та 18 міжнародних конференціях.

В цілому, представлена дисертаційна робота «Міксоміцети родини Reticulariaceae: молекулярна філогенія, морфологія і систематика» повністю відповідає вимогам п. 9.12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженою постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., а сам дисертант заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.21 – мікологія.

Професор кафедри ботаніки
Херсонського державного університету
Заслужений працівник освіти України,
доктор біологічних наук, професор

О.Є. Ходосовцев



Підпис О.Є. Ходосовцева
підтверджую начальник ВК В. Воробйова

В. Воробйова
09.03.2016р.

