

Правительство Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный университет»  
(СПбГУ)

УДК 574.2  
Рег № НИОКТР  
АААА-А20-120012490094-4  
Инв.№ 75326011

УТВЕРЖДАЮ  
Начальник Управления  
научных исследований СПбГУ  
\_\_\_\_\_ Е.В. Лебедева  
« » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

ОТЧЁТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Выявление «скрытого разнообразия» и построение современной системы  
центрохелид (Nartista: Centroplasthelida): 2021 г. этап 2  
(промежуточный)

По гранту РФФИ  
20-04-00928 от 23.03.21

Руководитель НИР,  
доцент,  
кандидат биологических наук

В.В. Златогурский

Санкт-Петербург  
2021

## Реферат

В ходе проведенного исследования был открыт и описан новый вид центрохелидных солнечников *Pterocystis infundibula*. Представители этого вида обладают необычной структурой радиальных чешуек. Вдоль аксоподий располагаются удлинённые чешуйки с воронковидным основанием и хорошо выраженным стволком. Однако, в пределах одной и той же клетки можно наблюдать также радиальные чешуйки с редуцированным или полностью отсутствующим стволком. В последнем случае они демонстрируют сходство с чешуйками рода *Pseudoraphidocystis*, что свидетельствует в пользу близкого родства этих двух родов. Ретикулярная структура радиальных чешуек нового вида напоминает таковую некоторых представителей *Raphidocystis* и уникальна в пределах *Pterocystis*. Также изучен новый изолят *Acanthocystis nicholli*, в отличие от уже известных не образующий кремниевых чешуек на трофической стадии, а также, что впервые показано для центрохелид формирующий цисты с органической стенкой. Органическая природа покровов подтверждена с помощью энергодисперсионного анализа. У другого изолята, идентифицированного как *Choanocystis perpusilla*, трофические стадии окружены слизистой капсулой (напоминая *Chlamydaster* spp.) в которую инкорпорированы органические спикулы. При этом при инцистировании формируются кремниевые чешуйки, характерные для *Ch. perpusilla*. Это первые данные по инцистированию солнечников с органическими покровами. Впервые изучены цисты *Raphidiophrys intermedia* демонстрирующие промежуточный вариант строения по сравнению с ранее описанными видами: стенка цисты имеет признаки мозаичной структуры со швами, однако слой мозаичных чешуек не выражен. Результаты получены с помощью разрезания цист сфокусированным ионным пучком галиевой пушки и дальнейшего изучения в сканирующем электронном микроскопе. Такое строение роднит *R. intermedia* с *R. heterophryoidea* с которым он группируется по данным проведённого молекулярно-филогенетического анализа. Благодаря изменённой методике пробоотбора, собран значительный объём новых данных по симбионтсодержащим центрохелидам. Впервые исследованы симбионтсодержащие *R. intermedia*. Также изучена серия из 5 независимых изолятов *Acanthocystis turfacea*, включающая впервые обнаруженных крупных бесцветных солнечников, которые по размерам не уступают симбионтсодержащим формам. Судя по предварительным данным, потеря симбионтов не приводит к уменьшению размеров, а мелкие бесцветные *A. turfacea* представляют собой самостоятельный вид. Обновлён чек-лист описанных видов центрохелид. Поданы две статьи в журналы, содержащие таксономические описания и современные данные по ранее описанным видам.

## Введение

Центрохелиды (*Centroplasthelida* Febvre-Chevalier et Febvre, 1984) – наибольшая по числу видов группа свободноживущих протистов в пределах бывшего таксона «солнечники» («*Heliozoa*»), на настоящий момент признанного полифилетическим. Положение центрохелид на древе эукариот долгое время не удавалось установить, однако на настоящий момент при участии руководителя проекта установлено, что они представляют одну из крупных линий эукариот – *Haptista*, будучи сестринской группой гаптофитовых водорослей. Центрохелиды - преимущественно бентосные фаготрофы, пищей которым

служат другие представители эукариот, благодаря чему они играют важную роль в пищевых цепях на микроуровне, выступая хищниками высшего порядка (apex predators). Центрохелиды встречаются практически повсеместно, в подавляющем большинстве биотопов, где наличествует жидкая вода: в морских биотопах (в бентосе, реже – в планктоне), включая глубоководные местообитания; в пресных реках и озёрах; в болотах; в составе активного ила; в почве; в грунтовых водах, во льду; в солёных континентальных водоёмах. В природных экосистемах центрохелиды могут достигать высокой численности (до 2462 клеток / л<sup>-1</sup>) и, вместе с другими «солнечниками» составляют до 30% биомассы протистов. При этом именно центрохелиды нередко являются доминирующим компонентом сообщества «солнечников». Центрохелид применяют в биоиндикации качества воды и в палеоклиматологии, они обладают потенциалом к использованию их в стратиграфии и криминалистике. Во многом это возможно благодаря наличию у этих организмов неорганического внешнего скелета – чешуек, имеющих видоспецифичное строение, которые сохраняются в окружающей среде даже после смерти организма. Недавно было показано, что центрохелидные солнечники (а точнее – их симбионты) могут выступать хозяевами вирусов, способных заражать человека. Несмотря на очевидно высокую значимость центрохелид, на настоящий момент они «выпадают» из комплексных исследований самой различной направленности в силу того, что (1) их биоразнообразие по большей части не описано; (2) система этой группы нуждается в значительной доработке; (3) простые и доступные неспециалистам подходы к идентификации отсутствуют. Актуальность данного проекта в том, что он направлен на решение всех трёх перечисленных проблем.

### **Основная часть отчёта о НИР**

В ходе работ по проекту в отчётном году были получены важные результаты, как связанные с выявлением скрытого разнообразия центрохелид, так и проливающие свет на биологию и эволюцию уже описанных таксонов с применением современных методов и подходов.

Нами был открыт и описан новый вид *Pterocystis infundibula*. Этот вид является уникальным и занимает совершенно особое место среди других представителей обширного рода *Pterocystis* (согласно обновлённому нами чек-листу этот род сейчас включает 22 описанных вида). Солнечники были обнаружены в пробах из Эйлатского залива Красного моря и развивались при солёности 34‰. Нам удалось выделить клональную культуру, которую поддерживали на искусственной морской воде с добавлением 0,05% церофила в качестве источника питательных веществ для роста бактерий и жгутиконосцев *Neobodo* в качестве жертвы. Была проведена морфометрия с использованием инвертированного микроскопа Leica DMI3000, оснащённого интегрированным модуляционным контрастом, с целью минимизировать искажения размера объектов. По данным измерений на девятости семи клетках было показано, что диаметр клетки варьирует в диапазоне от 10,53 до 19,03 мкм и в среднем составляет 13,73 мкм. Клетки солнечников имели сферическую форму, большинство их были одиночными и флотировали в толще воды. Время от времени наблюдали агрегаты клеток, насчитывающие от 2 до 5 индивидуумов. Аксоподии обычно превышали по длине

диаметр клетки в 2-3 раза и на них наблюдали отчётливые гранулы. Строение представителей нового вида было изучено методами световой и электронной микроскопии. Наибольший интерес представляет морфология скелетных элементов *P. infundibula*. Клетки солнечников покрыты двумя типами кремниевых элементов. К поверхности клетки прилегают пластинчатые чешуйки овальной или слегка яйцевидной формы, окружённые тонкой маргинальной каймой и несущие хорошо выраженное аксиальное утолщение. Длина пластинчатых чешуек составляла 1,99-3,02 (в среднем - 2,53) мкм (n=76), ширина - 1,10-1,54 (в среднем - 1,35) мкм (n=79). Периферический слой покровов клетки слагался радиальными чешуйками. Среди них широко представлены удлинённые чешуйки с хорошо развитым стволом, который плавно переходит в воронковидное основание. Воронковидное основание обладало коническим стебельком, оканчивающимся бульбовидным утолщением. Чешуйку окружала тонкая маргинальная кайма. На светооптических снимках живых клеток хорошо видно, что такие удлинённые радиальные чешуйки располагаются вблизи аксоподий, приподнимаясь вдоль их оснований. Уникальной чертой нового вида является наличие дополнительного типа радиальных чешуек с рудиментарным стволом. При этом удаётся наблюдать все стадии редукции ствола от слегка укороченного до полностью отсутствующего в пределах чешуек одной клетки. Длина радиальных чешуек составляла 1,39-5,22 (в среднем 2,88) мкм (n=47). Как ствол так и воронка были испещрены многочисленными отверстиями неправильной формы, что придаёт чешуйке вид сетчатого образования - ещё одна уникальная черта в пределах рода. В случае полной редукции ствола радиальные чешуйки *P. infundibula* становятся очень схожи с таковыми представителей другого рода - *Pseudoraphidocystis*, что указывает на близкое родство между двумя этими родами. Перфорированная и иногда почти сетчатая структура радиальных чешуек напоминает структуру пластинчатых чешуек у *Raphidocystis ambigua*, *R. symmetrica* и *R. tubifera* (Zlatogursky et al., 2018). За исключением сомнительного указания *Pterocystis anapoda* (Tong, 1994) и недавно описанного *P. pontica* (Prokina et al., 2019) и *P. jongsooparkii* (Zagumyonnyi et al., 2020) находки *Pterocystis* spp. в морских местообитаниях практически отсутствуют. Это скорее всего отражает неравномерность исследований, и последние находки, включая *P. infundibula* показывают, что представители этого рода представлены и разнообразны в водах мирового океана.

Также в отчётном году получены существенные результаты по уточнению деталей биологии и жизненных циклов уже изученных таксонов. Из пресноводного местообитания нами был выделен в культуру и изучен штамм КА-20.6.1, представленный солнечниками, покровы которых слагаются органическими спикулами. Анализ последовательности гена 18S рРНК, полученной нами показал, что этот изолят относится к *Acanthocystis nichollsi* - виду, который согласно классическому описанию лишён спикул и обладает кремниевыми чешуйками двух типов (Nicholls, 1983). Несмотря на наблюдение за культурой в течении длительного периода, никаких следов кремниевого скелета наблюдать не удалось. Подобный феномен может иметь как минимум две возможных интерпретации: (1) наличие у *A. nichollsi* сложного жизненного цикла, включающего смену стадий с органическими спикулами и кремниевыми чешуйками, при этом в условиях культуры проявляется только одна из них и (2) утрату способности кремнифицировать чешуйки, которая произошла как минимум у штамма КА-20.6.1, а возможно и в пределах какой-то эволюционной линии *A. nichollsi*, к которой принадлежит

данный штамм. Чтобы получить дополнительные аргументы в пользу одной или другой интерпретации мы решили отработать методику индукции инцистирования у солнечников. Во всех изученных случаях при инцистировании центрохелиды формируют цистные кремниевые чешуйки (Dürschmidt and Patterson, 1987a; Zlatogursky, 2013). Таким образом, выяснить будут ли они образовываться у штамма, не формирующего кремниевые чешуйки на стадии трофозоида представляло большой интерес. Мы испробовали различные способы индукции инцистирования, наиболее эффективным из которых оказался перенос клеток на “голодную” среду без жертвы. Получив таким образом цисты КА-20.6.1 и изучив их методом энергодисперсионного рентгеновского микроанализа мы показали, что кремниевые чешуйки и в этом случае не формируются и стенка цисты остаётся полностью органической - первый подобный случай задокументированный для центрохелид. Также мы изучили цисты *Acanthocystis turfacea* и показали, что в этом случае стенку цисты укрепляют дополнительные кремниевые чешуйки. Полученные данные свидетельствуют скорее в пользу того, что у штамма КА-20.6.1 мы наблюдаем утрату способности к кремнификации чешуек.

В контексте этих же вопросов лежат и результаты полученные по другому пресноводному штамму, который был выделен в культуру и изучен с помощью морфологии и молекулярно-филогенетических методов. По совокупности светооптических признаков этот штамм был идентифицирован как *Chlamydaster fimbriatus* - клетки адгезированы к субстрату, малоподвижны и окружены органической слизистой капсулой с бахромчатым краем (Dürschmidt and Patterson, 1987b). Тем не менее, при анализе полученной нами последовательности гена 18S рРНК методами молекулярной филогенетики было показано, что она занимает положение в пределах клады Ch1 среди представителей рода *Choanocystis*. Более того, с применением сканирующей электронной микроскопии показано, что бахромчатость обусловлена не структурой капсулы, а наличием в её стенке очень тонких и коротких многочисленных органических спикул. Аналогично предыдущему штамму мы индуцировали инцистирование и изучили структуру цист этих организмов. Несмотря на полное отсутствие кремниевых чешуек у трофозоитов, при инцистировании сформировались типичные для *Choanocystis* кремниевые чешуйки. При этом удалось идентифицировать их, как *Choanocystis perpusilla*. Таким образом, в отличие от предыдущего штамма здесь мы скорее имеем дело со стадиями сложного жизненного цикла, чем с утратой способности к кремнификации.

Ещё один изученный нами штамм пренадлежит к изученному виду *Raphidiophrys intermedia*. В наших предыдущих исследованиях, было показано, что для представителей рода *Raphidiophrys* характерны различные варианты строения стенки цисты и различные стратегии инцистирования. У *R. elongata* стенка цисты относительно тонка, цистные чешуйки перекрывают друг друга и организм эксцистируется механически разрушая оболочку цисты (Drachko et al., 2021). У *R. heterophryoidea* стенка цисты значительно более массивная, и такой механизм эксцистирования для этого вида, видимо, был бы затруднён. Вместо этого при эксцистировании оболочка цисты “расширяется” на множество мелких фрагментов, благодаря наличию особых мозаичных чешуек (Drachko et al., 2020). В этом году мы изучили сходными методами представителей *R. intermedia*. Как и в прошлых исследованиях был применён отработанный нами метод, в рамках которого высушенные цисты разрезали сфокусированным ионным пучком галиевой пушки и полученные срезы изучали методом сканирующей электронной микроскопии. В

результате такого анализа, было показано, что по структуре стенки цисты *R. intermedia* занимает промежуточное положение между двумя ранее изученными видами этого рода. Стенка цисты у этих организмов включает тонкий монолитный слой, размеченный неглубокими швами на сегменты, напоминающие мозаичные чешуйки *R. heterophryioidea*. По результатам молекулярно-филогенетического анализа гена 18S рРНК было показано, что *R. intermedia* ветвятся ближе к *R. heterophryioidea*, чем к *R. elongata*, что хорошо коррелирует с данным по строению цист. В то же время, чешуйки трофической стадии у *R. heterophryioidea* и *R. elongata*, в значительной мере сходны, а у *R. intermedia* отличаются. Таким образом, признаки строения цисты оказываются более значимым признаком, перспективным для систематики, так как он лучше коррелирует с независимыми источниками информации о филогенетическом родстве.

Ещё одним важным и результативным направлением работы стало изучение симбионтсодержащих представителей центрохелид. Солнечники, относящиеся к виду *Acanthocystis turfacea* представляют большой научный интерес, так как являются хозяевами симбиотических хлорелл *Chlorella helizoeae* (Pröschold et al., 2011), которые в свою очередь являются хозяевами вирусов АТСV, представляющих не только фундаментальный, но и практический интерес, в связи со способностью развиваться на слизистых человека (Yolken et al., 2014). В то же время большинство современных данных по этой системе основаны лишь на одном штамме хлорелл, выделенных из солнечника. Большой интерес представляет получение данных по другим изолятам с целью проверить, будут ли у других штаммов представлены те же виды хлорелл, какими вирусами они будут заражены и т. д. Помимо симбионтсодержащих, известны и бесцветные изоляты *A. turfacea*, обладающие скелетными элементами схожей формы, но значительно меньшими размерами (Zlatogursky and Klimov, 2016). Немаловажным является вопрос, представляют ли такие мелкие бесцветные формы самостоятельный вид или симбионты приобретаются и теряются в ходе жизни солнечников, в случае приобретения приводя к увеличению размеров. Симбионтсодержащие *A. turfacea* широко распространены в природе, однако сравнительно плохо растут в культуре и редко попадают в инкубированных пробах. В рамках работ по проекту в этом году, мы активно занимались поиском этих солнечников в свежих не инкубированных пробах из различных точек в Ленинградской области. При таком подходе клетки протистов должны быть сконцентрированы, так как их количество существенно меньше, чем в случае инкубации, когда клетки активно делятся и их численность возрастает. Для этого мы стали отбирать пробы сачками из мелкого газа, а также дополнительно фракционировать и концентрировать пробы в лаборатории. Последовательное применение такого подхода оказалось успешным и удалось изучить в общей сложности 5 независимых изолятов крупных *A. turfacea* из различных независимых точек. Все обнаруженные изоляты изучали методами световой и электронной микроскопии, а также замораживали в пробирках, с целью проведения последующей реакции множественного замещения. Такие препараты позволяют в дальнейшем, используя ПЦР с различными праймерами, получить последовательности маркерных генов солнечника, его симбионта, а также проверять образец на наличие в нём вирусов. Один из исследованных крупных симбионтсодержащих изолятов нам удалось поддерживать в культуре, с использованием выделенной нами инфузории *Cyrtolophosis tunicicola*, которая оказалась чрезвычайно удачным кормовым объектом для солнечников. Наличие живого активно растущего штамма открывает широкие возможности для

дальнейших экспериментов и непосредственных наблюдений. Помимо этого в культуру удалось вывести ещё один штамм *A. turfacea*, который, в отличие от прочих был полностью лишён симбионтов. При этом, по своим размерным характеристикам он не уступал симбионтсодержащим формам. Эта ситуация существенно отличается от описанной нами ранее (Zlatogursky and Klimov, 2016), когда бесцветные *A. turfacea* обладали меньшим диаметром клетки, и сами их скелетные элементы были существенно меньше по размеру. Мы планируем продолжить исследования *A. turfacea*, однако уже по имеющимся данным можно предположить что всё-таки существуют два вида солнечников со сходной формой чешуек, но различающиеся своими размерными характеристиками. Находка крупного бесцветного штамма показывает, что потеря симбионтов у *A. turfacea* возможна, но она не приводит к уменьшению диаметра клетки и размеров скелетных элементов. Мелкие бесцветные “*A. turfacea*”, судя по всему, представляют собой самостоятельный вид со сходной формой кремниевых чешуек. Особый интерес представляет также ещё один изученный нами симбионтсодержащий изолят, идентифицированный, как *Raphidiophrys intermedia*. Выше уже описано, что мы изучили морфологию цист бесцветных *R. intermedia* и получили по ним молекулярные данные. Все вопросы по поводу *A. turfacea* можно также задать и относительно симбионтсодержащих *R. intermedia*: какова природа симбионтов, являются ли симбионтсодержащие и бесцветные формы конспецичными, есть ли в симбионтах вирусы и насколько они различаются. Таким образом, обработка полученных нами данных по зелёным *R. intermedia*, несомненно должна принести очень ценные результаты.

Также мы обновляем и поддерживаем в актуальном состоянии чек-лист описанных видов центрохелид на сайте [zoology.bio.spbu.ru](http://zoology.bio.spbu.ru). На текущий момент он насчитывает 20 родов и 129 видов.

Цитированная литература:

- Drachko, D., Mikhailovskii, V., Shishkin, Y., Zlatogursky, V.V., 2021. Phylogenetic position and morphology of *Raphidiophrys elongata* sp. nov. (Haptista: Centroplasthelida) with notes on cyst wall structure and evolution. *Eur. J. Protistol.* 81, 125836. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125836>
- Drachko, D., Shishkin, Y., Zlatogursky, V.V., 2020. Phenotypic masquerade: Polymorphism in the life cycle of the centrohelid heliozoan *Raphidiophrys heterophryoidea* (Haptista: Centroplasthelida). *Eur. J. Protistol.* 73, 125686. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2020.125686>
- Dürschmidt, M., Patterson, D.J., 1987a. On the organization of the Heliozoa *Raphidiophrys ambigua* Penard and *R. pallida* Schulze. *Ann Sci Nat Zool* 8, 135—155.
- Dürschmidt, M., Patterson, D.J., 1987b. A light and electron microscopic study of a new species of centroheliozoon *Chlamydaster fimbriatus*. *Tissue Cell* 19, 365—376.
- Nicholls, K.H., 1983. Little-known and new heliozoans: the centrohelid genus *Acanthocystis* including descriptions of nine new species. *Can J Zool* 61, 1369—1386.
- Prokina, K.I., Zagumyonnyi, D.G., Mylnikov, A.P., 2019. Marine Centrohelid Heliozoans (Centroplasthelida Febvre-Chevalier et Febvre, 1984) From Bays of Sevastopol (the Black Sea Shore). *Russ. J. Mar. Biol.* 5, 377–384. <https://doi.org/10.1134/S1063074019050092>
- Pröschold, T., Darienko, T., Silva, P.C., Reisser, W., Krienitz, L., 2011. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 13, 350–364.
- Tong, S.M., 1994. The taxonomy and seasonal dynamics of heterotrophic flagellates in Southampton water, U.K. Ph. D. University of Southampton, England.

Yolken, R.H., Jones-Brando, L., Dunigan, D.D., Kannan, G., Dickerson, F., Severance, E., Sabunciyani, S., Talbot, C.C.Jr., Prandovszky, E., Gurnon, J.R., Agarkova, I.V., Leister, F., Gressitt, K.L., Chen, O., Deuber, B., Ma, F., Pletnikov, M.V., Etten, J.L.V., 2014. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

<https://doi.org/10.1073/pnas.1418895111>

Zagumyonnyi, D.G., Prokina, K.I., Tikhonenkov, D.V., 2020. First findings of centrohelid heliozoans (Haptista: Centroplasthelida) from marine and freshwater environments of South Korea. *Protistology* 14, 227–245.

Zlatogursky, V.V., 2013. Puzzle-like cyst wall in centrohelid heliozoans *Raphidiophrys heterophryoidea* and *Raineriophrys erinaceoides*. *Acta Protozool* 52, 229—236.

Zlatogursky, V.V., Drachko, D., Klimov, V.I., Shishkin, Y., 2018. On the phylogenetic position of the genus *Raphidocystis* (Haptista: Centroplasthelida) with notes on the dimorphism in centrohelid life cycle. *Eur. J. Protistol.* 64, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2018.03.006>

Zlatogursky, V.V., Klimov, V.I., 2016. Barcoding heliozoa: perspectives of 18S rDNA for distinguishing between *Acanthocystis* species. *Protist* 167, 555–567.

### **Заключение**

К вышеизложенному можно добавить, что статья по *Raphidiophrys elongata*, фигурировавшая в прошлогоднем отчёте опубликована в *European journal of Protistology*; результаты по *Raphidocystis pallida*, изложенные в прошлом отчёте подготовлены к печати и поданы в *Journal of Eukaryotic Microbiology*; результаты по *Pterocystis infundibula*, изложенные в текущем отчёте подготовлены к печати и поданы в журнал *Protistology*; прочие результаты, изложенные в текущем отчёте готовятся к публикации или находятся на стадии получения дополнительных данных. Таким образом, заявленные цели по подаче в журналы двух оригинальных статей, включающие таксономические описания и новые данные по известным видам выполнены в полном объёме.

### **Публикации**

Phylogenetic position and morphology of *Raphidiophrys elongata* sp. nov. (Haptista: Centroplasthelida) with notes on cyst wall structure and evolution; Drachko, D., Mikhailovskii, V., Shishkin, Y., Zlatogursky, V. V.; *Eur. J. Protistol.*, 125836; 2021.

*Pterocystis infundibula* sp. n. (Pterocystidae, Pterocystida, Centroplasthelida)—the new species of centrohelid heliozoans from the Gulf of Aqaba, Israel; Shishkin, Y., Drachko, D., Zlatogursky, V. V.; *Protistology*, сдано в печать

On the Phylogenetic Position of *Raphidocystis pallida* with Some Notes on Its Life Cycle; Drachko, D., Shishkin, Y., Zlatogursky, V. V.; *Journal of eukaryotic microbiology*, сдано в печать