

На правах рукописи



КЛЮЧКОВА Татьяна Андреевна

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ
СВЯЗЕЙ И СТРАТЕГИЯ СОВМЕСТНОГО ВЫЖИВАНИЯ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МОРСКИХ ЦЕНОЦИТНЫХ ЗЕЛЕНых
ВОДОРосЛЕЙ И ЗАДНЕЖАБЕРНЫХ МОЛЛЮСКОВ**

03.02.08 – Экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Петропавловск-Камчатский – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Камчатский государственный технический университет» (ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»)

Официальные оппоненты:

Усов Анатолий Иванович,

доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБУН «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН», лаборатория химии углеводов, главный научный сотрудник

Голохваст Кирилл Сергеевич,

доктор биологических наук, ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа естественных наук ДВФУ, заместитель директора по развитию, кафедра безопасности жизнедеятельности в техносфере, профессор

Шошина Елена Васильевна,

доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Мурманский государственный технический университет», кафедра биологии, заведующая

Ведущая организация:

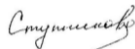
ФГБУН «Мурманский морской биологический институт» Кольского научного центра Российской академии наук, г. Мурманск

Защита состоится «18» мая 2017 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 307.008.01 в ФГБОУ ВО «Камчатский государственный технический университет» по адресу: г. Петропавловск-Камчатский, ул. Виллойская, 56.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке КамчатГТУ и на сайте ФГБОУ ВО «КамчатГТУ» www.kamchatgtu.ru

Автореферат разослан «__» февраля 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ступникова Н.А.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Высочайшее видовое разнообразие морской биоты создает высокую конкуренцию видов за пространственно-временные, пищевые и другие ресурсы, способствует формированию сообществ с многообразными, порой самыми неожиданными консортивными связями и формами сожительства видов, обеспечивающими им успех воспроизводства и сохранения. Интересным примером теснейшего взаимовыгодного сожительства являются ценоцитные зеленые водоросли и питающиеся ими заднежаберные моллюски. Первые необычны тем, что образованы крупными многоядерными клетками или одной гигантской многоядерной клеткой-сифоном, вторые – тем, что питаются водорослевой протоплазмой, ассимилируют находящиеся в ней хлоропласты в свои пищеварительные клетки и способны сохранять их там в живом, функциональном состоянии.

Необычное строение ценоцитных водорослей, казалось бы, только увеличивает вероятность их травмирования при механическом или биотическом воздействии. Вытекание протоплазмы из крупных клеток и сифонов в окружающую среду должно было бы приводить к массовой гибели растений и вымиранию видов. Однако данная группа водорослей до сих пор процветает, особенно в теплых и теплоумеренных водах Мирового океана. Выяснение способов выживания ее представителей и механизмов их посттравматической регенерации интересно не только для понимания способов сохранения таких уникальных в цитологическом отношении видов, но и для решения практической задачи – выделения из них химических соединений, способствующих «ранозаживлению» плазматических мембран и клеточных стенок ценоцитных водорослей, и их последующего использования в медицине и фармацевтике. Выяснение механизмов «подселения» в клетки животных чуждых им по природе органелл растительных клеток и формирование симбиотических взаимоотношений на внутриклеточном уровне не менее значимо для развития биологии, поскольку расширяет представления о сущности жизни, формировании взаимосвязи и взаимозависимости видов как основы единства и целостности живой материи.

Степень разработанности выбранной темы. Способность морских ценоцитных зеленых водорослей формировать протопласты из вытекшей в морскую воду протоплазмы была открыта еще в начале 70-х гг. прошлого века (Tatewaki, Nagata, 1970; La Claire II, 1982a,b; Kobayashi, Kanaizuka, 1985; Pak et al., 1991). Однако все ранние исследователи, не вникая в суть биохимических преобразований первичной оболочки, не дали должной оценки этому уникальному в живой природе явлению – сохранению и продолжению жизни в структурах, не имеющих плазмалеммы, т.е. *жизни без клеточной мембраны*. Мы впервые определили, что первичная оболочка протопластов состоит из полисахаридов и не является липопротеидной мем-

браной, а также изучили этапы и условия ее формирования (Kim et al., 2001, 2002; Kim, Klotchkova, 2004; Klotchkova et al., 2003). Мы также определили, что агглютинация клеточных компонентов в морской воде (т.е. первый этап формирования протопластов) осуществляется посредством комплементарной лектин-углеводной связи (Kim et al., 2002).

Изучение клептопластии у заднежаберных моллюсков было начато также в прошлом веке. До последних лет считалось, что некоторые их виды, называемые «фотосинтетические» моллюски (Trench, 1975) или «моллюски на солнечных батарейках» (Rumpho et al., 2000; Sea slug forum, 2017), могут длительное время жить за счет продуктов фотосинтеза клептопластид (Mujer et al., 1996; Pierce et al., 1996; Rumpho et al., 2001, 2008, 2011), регуляцию которого на генном уровне осуществляют ядра моллюсков, принявшие в свой геном водорослевые гены, кодирующие процессы фотосинтеза (Rumpho et al., 2000, 2001). Отказ от этой гипотезы (Bhattacharya et al., 2013) оставил открытым вопрос, каким образом на молекулярном уровне регулируется процесс фотосинтеза, происходящий в чужеродных для животных клеток растительных органеллах. Достаточные цитологические и молекулярно-генетические данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, отсутствовали. Биология развития видов, связанных столь необычными симбиотическими связями, оставалась неизученной.

Цель работы – выявить механизмы формирования симбиотических связей между ценоцитными зелеными водорослями и морскими заднежаберными моллюсками на внутриклеточном уровне при сосуществовании внутри клеток моллюсков органелл животного и растительного происхождения.

Для достижения цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Подобрать для исследования виды ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков, образующих трофические ассоциации, изучить биологию их развития, разработать методы культивирования и содержания в лабораторных условиях.

2. Охарактеризовать лектины, участвующие в агглютинации протоплазмы у водоросли *Bryopsis plumosa* в процессе ее преобразования *in vitro* в новые функциональные клетки; изучить экспрессию генов в протопластах и появившихся из них клетках; изучить способность протоплазмы разных видов ценоцитных зеленых водорослей к спонтанной гибридизации.

3. Определить таксономическое положение изученных видов заднежаберных моллюсков и таксономическую ценность признаков, используемых для их диагностики, и влияние питания на их изменчивость.

4. Изучить строение пищеварительных клеток заднежаберных моллюсков, включающих растительные органеллы, в разные периоды их голодания.

5. Определить функциональную активность клептопластид в разные периоды голодания изучаемых моллюсков и их роль в их питании; провести транскриптомный анализ и поиск у моллюсков генов, кодирующих фотосинтез.

Научная новизна. Впервые приводится молекулярная характеристика новых лектинов водорослей – бриохилина и BPL-3, участвующих в процессе «сборки» протопластов у *Bryopsis plumosa*. Их аминокислотный состав и молекулярная структура отличаются от всех известных лектинов наземных растений, животных и водорослей и являются новыми для науки. Это открытие было отмечено журналом «Journal of Phycology» в разделе «Algae – Highlights» (Grossman, 2006). Впервые выполнен протеомный анализ протопластов у *B. plumosa* и появившихся из них клеток и показано, что на каждом этапе их жизни значительно различается белковый профиль. Впервые изучены механизмы защиты от спонтанной гибридизации протоплазмы растений разных видов ценоцитных зеленых водорослей и разработан метод внедрения в протопласты чужеродных клеток и микрочастиц.

При изучении взаимоотношений ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков обнаружено, что пищеварительные клетки моллюсков включают все компоненты водорослевой протоплазмы, в том числе и ядра, т.е. наряду с клептопластией имеет место клептокариоз. Впервые определено, что фотосинтетическая активность клептопластид во многом определяется составом водорослевого корма. Он, в свою очередь, влияет на морфометрические признаки и развитие моллюсков. Впервые установлено, что клептопластиды – это, прежде всего, поддерживаемые в живом состоянии резервные пищевые ресурсы, а не поставщики основного питания, достаточного для выживания голодающих моллюсков. Впервые созданы и проанализированы транскриптомные базы данных для моллюсков *Elysia atroviridis*, *Elysia nigrocapitata* и *Placida babai* и водоросли *B. plumosa*. В транскриптоме моллюска *E. atroviridis* обнаружено несколько потенциальных кандидатов генов, кодируемых геномом хлоропластов. Их нахождение не исключает вероятности горизонтального переноса генов (ГПГ) от водорослей к моллюскам.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные изучения молекулярных и клеточных механизмов симбиотических связей ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков могут дополнить учебные курсы альгологии и клеточной биологии. Часть из них уже вошла в зарубежные учебники по альгологии (Lee, 2008, раздел «Evolution of the chloroplast»; Hurd et al., 2014) и в справочник по эволюционному мышлению в науках (Heams, 2015, раздел «Synthetic biology and Darwinism»). Разработанный автором метод выделения лектинов, участвующих в агглютинации протоплазмы, с незначительными модификациями может быть использован для их выявления у других водорослей. Выделены и охарактеризованы новые водорослевые лектины, принадлежащие к еще не описанному классу. Выделенные фитогемагглютинины бриохилин и BPL-3 перспективны для дальнейшего изучения с целью использования в медицине. Данные по морфологии, анатомии, лабораторному

культивированию и систематике заднежаберных моллюсков могут дополнить учебные курсы зоологии, использоваться для культивирования ценных с медицинской точки зрения видов.

Методология и методы диссертационного исследования. В основу методологии проведенных исследований положен системный подход, при котором живая система рассматривается как множество иерархически связанных между собой элементов, составляющих функциональное единство. В ходе исследования были использованы современные методы морфолого-анатомических, экологических, гидробиологических, цитологических, молекулярных и биохимических исследований. Для транскриптомного анализа заднежаберных моллюсков и *Bryopsis plumosa* использовали метод секвенирования нового поколения (NGS, 454 pyrosequencing & Illumina platform); поиск потенциальных генов осуществляли с помощью компьютерной программы GMAS (Genome Mining and Analysis System), имеющей автоматическое подключение к базе данных NCBI (2017; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Положения, выносимые на защиту.

1. В процессе «сборки» протопласта у *Bryopsis plumosa* участвуют новые гликопротеины, принадлежащие к еще не описанному классу лектинов. Безмембранные протопласты осуществляют активный синтез белков.

2. «Фотосинтетические» моллюски захватывают в свои пищеварительные клетки ступки водорослевой протоплазмы, включая ядра, при этом протоплазма не теряет способности к агглютинации и автономному существованию внутри клетки моллюска.

3. Скорость деградации хлоропластид возрастает на свету, а при тусклом свете или в полной темноте они более стабильны.

4. Взаимовыгодное сожительство моллюсков и водорослей позволяет первым эффективно запасать внутри своих клеток живую водорослевую протоплазму и получать в процессе ее длительного «хранения» дополнительные пищевые ресурсы, а вторым – возможность эффективно размножаться путем формирования протопластов *in vitro*.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследования обеспечивает использование современных методов, многократная повторность экспериментов. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности лектина бриохилин (*Bryohealin*) и BPL-3 зарегистрированы в базе данных NCBI с присвоением следующих порядковых номеров: EU769118 (бриохилин), KX867966 (BPL-3). Созданные с участием автора диссертации транскриптомные базы данных для моллюсков *Elysia atroviridis*, *Elysia nigrocapitata* и *Placida babai* и водоросли *Bryopsis plumosa* загружены в генбанк «Phycogene» (www.genebank.kongju.ac.kr). Новые сиквенсы для моллюсков были зарегистрированы в базе данных NCBI с присвоением следующих порядковых номеров: *E. atroviridis* – KY061146 (16S рПНК), KY061147 (28S рПНК) и KY061148 (*Cox1*);

E. nigrocapitata – JX524802, KY061149 (16S рPHK), JX524803, KY061150 (28S рPHK) и JX524804, KY061151 (*Cox1*); *P. babai* – KY050762 (16S рPHK), KY050761 (28S рPHK), KY050760 (*Cox1*) и KY050759 (гистон H3).

Личный вклад автора. Автор собрала основную часть изученных видов водорослей и все изученные виды моллюсков и культивировала их в лабораторных условиях, выполнила все микроскопические исследования и фотографирование объектов; подготовила материалы для ПЭМ, протомного анализа протопластов, провела все эксперименты по изучению формирования и гибридизации протопластов и внедрению в них чужеродного материала. Для выделения лектинов бриохилин (*Bryohealin*) и VPL-3 и создания рекомбинантной ДНК бриохилина автор подготовила материал для исследований, подобрала химические реактивы и буферные растворы, провела эксперименты для выявления гемагглютинативной активности водорослевого экстракта и выделенных лектинов, провела биоинформационный анализ полученных сиквенсов. При изучении систематики заднежаберных моллюсков автор готовила материал для исследования, провела полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и биоинформационный анализ полученных сиквенсов. В ходе поиска у заднежаберных моллюсков генов, кодирующих фотосинтез, автор подготовила пробы для РАМ-флуорометрии и выделения мРНК, проанализировала транскрипты моллюсков и *B. plumosa* и интерпретировала полученные данные. Автор принимала непосредственное участие в подготовке всех опубликованных по материалам диссертации статей и тезисов докладов. Молекулярные исследования были проведены при финансовой поддержке Национального исследовательского фонда Республики Корея и гранта Др. Г.Х. Кима «Extreme Genomics Program», соисполнителем которого являлась автор диссертации.

Апробация результатов. Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались автором на следующих конференциях: «Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки» (Владивосток, 2008); на ежегодных конференциях корейского альгологического общества (Korean Society of Phycology (KSP), Республика Корея, 2005, 2007, 2009); XVIII международном водорослевом симпозиуме (International Seaweed Symposium (ISS), Берген, Норвегия, 2004); международном симпозиуме «Морские водоросли и глобальное потепление» (Сеул, Республика Корея, 2006); IV европейской альгологической конференции (European Phycological Conference, Овьедо, Испания, 2007); Тихоокеанско-азиатском альгологическом форуме (Asian Pacific Phycological Forum, Бангкок, Таиланд, 2005; Ёсу, Республика Корея, 2011). Их научная значимость отмечена оргкомитетом ISS (Берген, Норвегия, 2004) присуждением высшей награды (Sunniva and Egil Vaardseth's Legacy Award) и оргкомитетом KSP (Тэджон, Республика

Корея, 2005) присуждением высшей награды. Результаты также докладывались на заседании Камчатского отделения Русского ботанического общества (Петропавловск-Камчатский, 2005).

Публикации. Всего автором опубликовано 53 статьи в рецензируемых научных журналах, 1 коллективная монография, 1 глава в книге и 80 материалов и тезисов докладов научных конференций. По материалам диссертации опубликовано 10 тезисов докладов, представлявшихся автором в России и за рубежом, 1 коллективная монография и 15 статей: 12 – в международных рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus (Elsevier) и Thomson Reuters (идентификационный номер автора в Scopus: 12792241800), 2 – в российском рецензируемом научном журнале из списка ВАК, 1 – в другом издании.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 224 страницах, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов и списка литературы, включает 56 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 245 публикаций, из них 209 иностранных и 15 ссылок на интернет-источники.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность идеологам моей работы: профессору Национального университета Конджу (Республика Корея), Др. Г.Х. Киму (Prof., Dr. Kim Gwang Hoon, Kongju National University), в лаборатории которого мне посчастливилось работать, и д.б.н. Н.Г. Ключковой (ФГБОУ ВО «КамчатГТУ») за постоянную и неоценимую поддержку на всех этапах становления моего научного мировоззрения. Я также признательна профессору университета Хоккайдо (Саппоро, Япония), Др. Т. Мотомуре (Prof., Dr. Taizo Motomura) за возможность использовать научное оборудование его лаборатории, предоставление необходимых для трансмиссионной микроскопии реактивов и за ценные консультации в области ультраструктуры клеток изучаемых мною организмов. Благодарю также профессора Национального университета Чоннам (Республика Корея) Др. К.Е. Кима (Prof., Dr. Kim Kwang Young) за обеспечение оборудованием, необходимым для РАМ флуорометрии. Богатым опытом в области молекулярной систематики со мной делился профессор университета Веллингтона Др. Д.К.Г. Цуккарелло (Prof., Dr. Joe Zuccarello). Я искренне благодарю за многолетнее сотрудничество коллег-альгологов и сотрудников кафедры экологии и природопользования ФГБОУ ВО «КамчатГТУ».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (**глава 1**) включает два раздела. В разделе 1.1 подробно описаны открытие так называемых «фотосинтетических» моллюсков, явление «клептопластии», выдвижение гипотезы горизонтального переноса генов, регулирующих фотосинтез клептопластид, от водорослей к моллю-

скам и ее опровержение. В научном мире в течение 44 лет (1969–2013) было общепринятым представление, что моллюски получают дополнительные энергетические ресурсы за счет фотосинтеза поглощенных ими хлоропластов и что именно это обеспечивает им выживание в условиях длительного и полного отсутствия кормовой базы. Представление, что однократный прием пищи и накопление в теле слизи клеттопластид обеспечивает им длительное голодание и существование за счет фотосинтеза было принято *de facto*, как и утверждение, что все поступившие в клетки моллюсков водорослевые ядра погибают и живыми в них остаются только хлоропласты (Mujer et al., 1996; Pierce et al., 1996; Rumpho et al., 2000, 2001; Schwartz et al., 2010).

Интерпретация столь необычного явления – сосуществования в одной клетке и животных, и растительных функционирующих органелл – привело к предположению о том, что в истории развития моллюсков имел место горизонтальный перенос генов (ГПГ), кодирующих фотосинтез, от водорослей, составляющих их пищу (Mujer et al., 1996; Pierce et al., 1996, 2012; Rumpho et al., 2000, 2001, 2008; Schwartz et al., 2010). Однако когда с 2010 г. в альгологии стали использовать метод секвенирования нового поколения (New Generation Sequencing, 454 pyrosequencing), гипотезу ГПГ от водорослей к моллюскам сразу же поставили под сомнение, поскольку белков, кодируемых ядерным геномом водорослей и непосредственно регулирующих фотосинтез клеттопластид, в транскриптомах трех так называемых «фотосинтетических» моллюсков не было (Pelletreau et al., 2011; Rumpho et al., 2011; Wägele et al., 2011). В 2013 г. было опубликовано опровержение гипотезы ГПГ от водорослей в моллюсках (Bhattacharya et al., 2013), однако другая исследовательская группа продолжает на ней настаивать (Schwartz et al., 2014). Таким образом, многолетние исследования, посвященные изучению механизмов, обеспечивающих функционирование клеттопластид, зашли в тупик.

Примечательно, что «фотосинтетические» моллюски питаются ценочитными зелеными водорослями, при этом у них существует очень жесткая пищевая привязанность к определенным видам водорослей (Floyd, O’Kelly, 1990; Jensen, 1993). Исключением является *Elysia chlorotica*, для которой пищей служит желто-зеленая ваушериевая водоросль, *Vaucheria litorea*. Вплоть до начала наших исследований никто из авторов симбиотических ассоциаций «фотосинтетический» моллюск-водоросль не принимал во внимание способность водорослей, составляющих пищу моллюсков, к выживанию в экстремальных условиях, и рассуждения всегда велись с точки зрения: «Как моллюск сохраняет клеттопластиды?». В своем исследовании мы впервые ставим вопрос по-другому: «Почему протоплазма определенных видов водорослей не гибнет даже внутри клеток моллюска, а вступает с ними в эндосимбиотические взаимоотношения?».

С этой целью в разделе 1.2 приводится обзор особенностей цитологической и морфологической организации ценоцитных зеленых водорослей, составляющих пищу «фотосинтетических» моллюсков, а также обзор процесса формирования протопластов *in vitro* из вытекшей протоплазмы. Это уникальное явление свойственно многим представителям морских ценоцитных зеленых водорослей (Kim et al., 2001, 2002; Kim, Klotchkova, 2004; Klotchkova et al., 2003). Их протоплазма всегда вытекает из поврежденной клетки-сифона в виде сгустков, и затем в морской воде происходит агглютинация *клеточных компонентов* (Kim et al., 2002; Klotchkova et al., 2003), и в результате формируется протопласт в первичной оболочке (Kim et al., 2001). Только через несколько часов эта первичная оболочка заменяется липидной мембраной (Kim et al., 2001). Ранее нам удалось разработать метод выделения из протоплазмы *Bryopsis plumosa* лектина, вовлеченного в процесс агглютинации клеточных компонентов при формировании протопластов *in vitro* (Т. Клочкова, 2003а,б), однако его молекулярные характеристики и нуклеотидная и аминокислотная последовательности остались неизученными.

Глава 2. Материалы и методы исследований

Для проведения исследований автор использовала живые образцы микро- и макроводорослей, выращенные в лабораторных культурах. Для получения протопластов и их культивирования слоевища морских ценоцитных зеленых водорослей разрушали на предметном стекле в малом количестве морской среды (IMR medium; Klotchkova et al., 2006), и выдавленную протоплазму переносили затем стерильной пипеткой в чашку Петри с морской средой. Контроль за состоянием культивируемого материала проводили под инверсионным микроскопом (Olympus IX70).

Для выделения лектинов бриохилин и ВРЛ-3, вовлеченных в процесс агглютинации клеточных компонентов *Bryopsis plumosa*, использовали метод аффинной хроматографии. Подготовленный особым образом водорослевый экстракт (Kim et al., 2002) заливали в N-ацетил-D-глюкозамин-агарозную аффинную колонку, выдерживали в ней в течение 10–12 ч, после чего удаляли, а колонку промывали раствором искусственной морской воды с рН 8 и соленостью 450 ммоль NaCl. Бриохилин элюировали 0,5 М раствором N-ацетил-D-глюкозамина в искусственной морской воде. Затем из колонки элюировали ВРЛ-3 с использованием раствора N-ацетил-D-галактозамина, поскольку для него этот углевод оказался более специфичным. Фитогемагглютинативную активность выделенных лектинов тестировали с использованием эритроцитов человеческой крови. Подробно методика описана в наших работах (Kim et al., 2002, 2006; Yoon et al., 2008; Jung et al., 2010; Han et al., 2011, 2012; Shim et al., 2012).

Для выявления наличия у бриохилина углеводного остатка лектин был подвергнут расщеплению глюкозидазой, а его химическую дегликолиза-

цию проводили с использованием раствора трифторметансульфокислоты (Sojar, Bahl, 1987). Точный молекулярный вес лектинов определяли методом МАЛДИ масс-спектрометрии. Для определения их аминокислотного состава проводили PICO-TAOTM-анализ (Waters, Milford, USA). После секвенирования образцов осуществляли поиск гомологичных сиквенсов в базе данных NCBI с помощью программ из пакета BLASTp.

Для определения способности протопластов ценоцитных зеленых водорослей включать в себя инертные частицы использовали суспензию частиц нетоксичного флуоресцентного пластика размером 0,02–2 мкм (желто-зеленые флуоресцентные карбоксилированные микросферы; Molecular Probes). Для определения способности протопластов включать в себя одноклеточные микроводоросли использовали виды *Chlamydomonas* sp., *Chlorococum* sp. и *Porphyridium purpureum*. Для изучения спонтанной гибридизации протоплазмы растения разных видов ценоцитных зеленых водорослей помещали вместе на предметное стекло и разрушали в малом количестве морской воды. Для того чтобы определить, как взаимодействуют между собой отмытые от жидкого вещества протоплазмы органеллы разных видов водорослей, протоплазма каждого вида выдавливалась из сифона отдельно в искусственную морскую воду с рН 6,0 и центрифугировалась на скорости 2,000g в течение 2 мин, и затем органеллы разных видов соединяли в одной пробирке и помещали в морскую среду (IMR medium). Для того чтобы гибридизировать клеточные органеллы одного вида с жидким веществом протоплазмы другого вида, вначале получали жидкую фракцию протоплазмы *Microdictyon umbilicatum* без органелл, а затем ее соединяли с отмытыми от жидкого вещества протоплазмы органеллами разных видов *Bryopsis* и *Chaetomorpha moniligera*.

Методы сбора моллюсков и их культивирование в лабораторных условиях, а также эксперименты по их кормлению описаны в наших работах (Klochkova et al., 2010, 2013; Клочкова и Ким, 2016). Для подсчета особей в поле была установлена рамка размером 10 × 10 м; количество особей определяли каждые две недели с июля 2009 г. по август 2011 г. Животных выращивали в инкубационных шкафах в чашках Петри размером 9 × 5 см, наполненных морской средой IMR medium, и в постоянно аэрируемом аквариуме 150 см длиной, 60 см шириной и 60 см высотой.

Для определения функционирования водорослевых хлоропластов в клетках моллюсков и вычисления их фотосинтетической активности использовали РАМ флуорометр (Walz, Effeltrich, Germany). Здоровых особей, собранных в природе, помещали в лабораторные условия при температуре 20°C, долготе дня 12 ч света : 12 ч темноты и освещенности 15 μмоль фотон·м⁻²·с⁻¹ на две недели с регулярной переменной водорослевого корма. При этом смешивание разных видов водорослей исключали. После двух недель кормления всех животных разделили на экспериментальные группы,

и первую группу поместили в условия постоянной темноты (0 фотон·м⁻²·с⁻¹), а другие группы – в условия постоянной освещенности (40, 80, 130, 200, 220, 450 μмоль фотон·м⁻²·с⁻¹, без цикла темноты). Условия постоянной освещенности были выбраны нами для того, чтобы полностью нарушить дневной ритм фотосинтеза у ассимилированных клептопластид и выяснить наличие какого-либо эффекта от их присутствия в теле моллюска. Максимальные показатели фотосистемы II (PSII maximum quantum yield, Fv/Fm) измеряли ежедневно в одинаковое время с использованием Diving-PAM флуорометра. Прибор помещали на расстоянии 5 мм от поверхности тела моллюска и запись измерений проводили только после его стабилизации.

Для фотографирования объектов в просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе (ПЭМ) образцы тканей моллюсков и протопластов *B. plumosa* и *Chaetomorpha aerea* изготавливали по методикам, описанным в наших работах (Klotchkova et al., 2003; Klochkova et al., 2013, 2016; Клочкова и Ким, 2016).

Выделение ДНК моллюсков проводили согласно протоколу фирмы-производителя набора реактивов G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron Biotech, Seoul, Korea). Анализ сиквенсов проводили с помощью программы Geneious (ver. 7.1.8, Biomatters, Auckland), имеющей автоматическое подключение к базе данных NCBI. Молекулярно-филогенетические деревья выстраивали методом байесовского вывода (MrBayes 3.2.2; Ronquist, Huelsenbeck, 2001), скомбинированным с анализом максимального правдоподобия (RAxML 7.2.8; Stamatakis, 2014).

Для определения белкового профиля протопластов и клеток *Bryopsis plumosa* методом двумерного электрофореза (2D) в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) были приготовлены пробы протопластов и появившихся из них клеток через 3, 12, 24 и 48 ч после истечения протоплазмы из клетки-сифона в морскую воду. В качестве контрольной группы для составления протеомных карт использовали неповрежденные вегетативные растения *B. plumosa*. Методика подготовки проб для проведения протеомных анализов описана в наших публикациях (Kim et al., 2008; Han et al., 2011, 2012, 2014, Klochkova et al., 2016). Поиск гомологичных белков осуществляли с помощью пакета BLASTp в NCBI и программы ProFound (Rockefeller University, USA, <http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>).

Для проведения сравнительного транскриптомного анализа моллюсков и *B. plumosa* выделяли матричную РНК из кладок яиц моллюсков и из водорослей. Затем на ее матрице была синтезирована комплементарная ДНК по методике, описанной в нашей работе (Han et al., 2015). После секвенирования транскриптов и сборки сиквенсов был проведен поиск потенциальных генов в компьютерной программе GMAS (Genome Mining and Analysis System), имеющей автоматическое подключение к базе дан-

ных NCBI. Транскрипты всех организмов сравнивали между собой на предмет нахождения гомологичных генов и дополнительно с базой данных генома хлоропласта модельного организма *Arabidopsis thaliana* (Kleffmann et al., 2004).

Главы 3–7. (Результаты исследования и их обсуждение)

В главе 3 приводится описание основных видов макроводорослей, использованных в диссертационном исследовании для кормления моллюсков – представителей родов *Bryopsis* и *Chaetomorpha*. Включены данные по их распространению, морфологии, размножению, способности к восстановлению слоевищ после получения обширных травм. Эта информация необходима для представления и обсуждения включенных в диссертацию результатов и аргументированности выводов по формированию симбиотических связей между моллюсками и водорослями. У представителей обоих родов в сложном диплогапобионтном жизненном цикле образование протопластов является генетически закрепленным способом вегетативного размножения.

В главе 4 приводится описание морфологии, распространения, биологии развития и влияния рациона питания на изменение габитуса трех видов моллюсков, использованных в диссертационном исследовании для изучения их питания ценоцитными зелеными водорослями. Обсуждаются развитие особей в лабораторных и природных условиях и их молекулярная систематика. Из семи видов собранных нами морских заднежаберников (Klochkova et al., 2010) для лабораторного содержания и экспериментов по ряду критериев были выбраны *Elysia atroviridis*, *Elysia nigrocapitata* и *Placida babai*, поскольку они представляли собой три разных типа «фотосинтетических» моллюсков:

1) асезонный эфемер, живет в природе 1–2 месяца, осуществляет кратковременный захват клептопластид – *P. babai* (рисунок 1.1);

2) однолетний вид, употребляет в качестве корма разные виды ценоцитных зеленых водорослей, в зависимости от вида поглощаемых водорослей осуществляет кратковременный или долговременный захват клептопластид, способен пережить пятимесячное голодание, при этом потери в весе и размере 93–97% – *E. nigrocapitata* (рисунки 2.4–2.7);

3) однолетний вид, осуществляет долговременный захват клептопластид, способен пережить около трех месяцев голодания, при этом потери в весе и размере не более 30% – *E. atroviridis* (рисунки 2.1–2.3).

Выполненные нами эксперименты по кормлению *P. babai* (глава 4, раздел 4.1) показали ее высокую пищевую привязанность к корму из *Bryopsis* (рисунок 1.2). Только в редких случаях (10%) ее голодные особи могут перейти на питание цитоплазмой *Codium* и *Derbesia*. Несмотря на

то, что протоплазма *B. plumosa*, проходя через ротовую полость и пищевод *P. babai*, подвергается пищеварению, в ее полупереваренной массе, попадающей в морскую воду после дефекации моллюска, часть органелл остаются неповрежденными. Попадая в морскую воду, неповрежденные протоплазматические сгустки покрываются полисахаридной оболочкой и формируют протопласты. Затем у них образуются плазматическая мембрана и клеточная стенка, и впоследствии они формируют взрослые растения *Bryopsis*. Таким образом, несмотря на то, что в процессе поедания *Bryopsis* плацида активно уничтожает его, одновременно она способствует его вегетативному размножению посредством формирования протопластов *in vitro*. Только из одного съеденного ею кустика *Bryopsis* от его протопластов за короткий срок может вырасти более сотни новых растений.

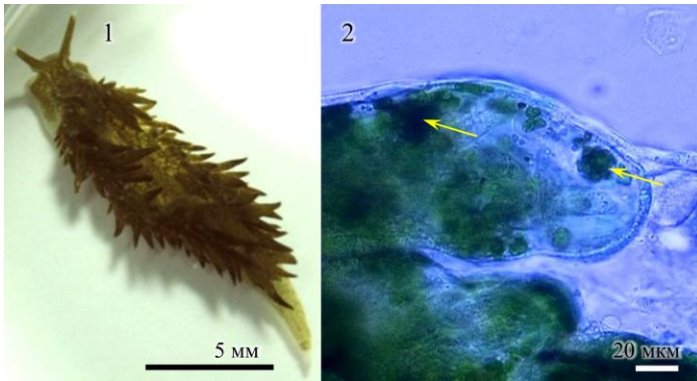


Рисунок 1 – Морфология половозрелой особи *Placida babai* (1) и микрофотография папиллы, наполненной сгустками протоплазмы *Bryopsis plumosa* (2). Крупные сгустки протоплазмы внутри папиллы показаны стрелками

Что касается моллюска *E. nigrocapitata* (глава 4, раздел 4.2), мы приводим его первое подробное описание, поскольку до начала наших исследований общая информация по этому виду была крайне скудна, его анатомия и биология развития никогда не изучались и явление клептопластии не отмечалось. Нами было установлено, что основные диагностические морфологические признаки *E. nigrocapitata* – окраска тела, нахождение черной полосы по краю вентральной стороны параподий, мелкие белые пятнышки на их поверхности, а также белое или желтоватое пятнышко на шее, – подвержены изменчивости и зависят от состава водорослевого корма. Это следует иметь в виду при использовании данных признаков в качестве таксономических.

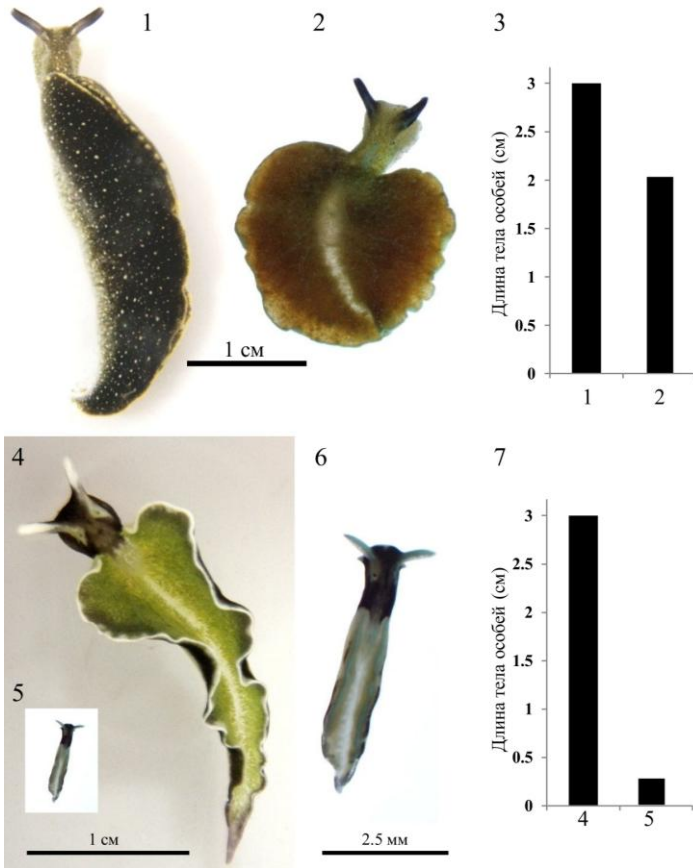


Рисунок 2 – Различия размеров тела у *Elysia atroviridis* (1–3) и *Elysia nigrocapitata* (4–7). 1, 4 – откормленные особи; 2 – особь *E. atroviridis*, перенесшая трехмесячное голодание; 5 – особь *E. nigrocapitata*, перенесшая пятимесячное голодание; 6 – увеличенная фотография особи, перенесшей голодание; 3, 7 – абсолютные изменения размеров тела у особей, показанных на рис. 1–2 и 4–5

В зависимости от рациона длина особей *E. nigrocapitata* варьирует от 3 до 30 мм. Длина взрослых особей в природе достигает 14–17 мм, но в лаборатории после полного двухмесячного голодания они полностью теряют зеленую окраску, а к 5-му месяцу голодания их длина уменьшается до 2–3 мм, а вес – до 1,5–2 мг. Размер тела мог уменьшаться и вновь уве-

личиваться в 7–10 раз, но животные при этом не погибали. Например, когда животных, постоянно кормившихся *Chaetomorpha moniligera* и достигших 30 мм в длину, подвергли полному голоданию в течение 2–3 месяцев, они потеряли вес и уменьшились до 3 мм в длину. Уже через 3–4 недели после возобновления кормления *C. moniligera* они снова набрали вес и достигли 25 мм длины. Длина тела животных, кормящихся *Bryopsis* spp., достигала только 5–13 мм, а когда в их рационе присутствовала только *Phyllocladon orientale*, они оставались маленькими, 3–5 мм в длину.

Что касается моллюска *Elysia atroviridis* (глава 4, раздел 4.3), до начала наших исследований общая информация по этому виду также была крайне скудна. Мы впервые приводим подробное описание его морфологии, биологии развития и влияния рациона питания на изменение габитуса. Предпочтительным кормом для *E. atroviridis* является *Bryopsis*. В очень редких случаях голодные особи способны заменить его на нитчатые спорофиты *Derbesia tenuissima*. Максимальный период голодания у этого вида составлял около трех месяцев, потери в весе и размере при этом были не более 30%. В периоды длительного голодания тело слизней приобретало коричневатый оттенок (рисунок 2.2).

В последнем разделе главы 4 (раздел 4.4) рассмотрены особенности содержания и воспроизводства заднежаберных моллюсков в лабораторных условиях. Поскольку в современном мире возрастает антропогенная деградация прибрежных экосистем и происходит уменьшение биоразнообразия (Н. Ключкова, Березовская, 2001; Адрианов, 2004; Очеретяна и др., 2015), существует необходимость разработки биотехники лабораторного культивирования сакоглоссов как модельных объектов экспериментальных исследований. Сведения о развитии заднежаберных моллюсков в искусственных условиях приводятся в немногих публикациях (West, 1979; West et al., 1984; Trowbridge, 1989, 2000; Curtis et al., 2007; Pelletreau et al., 2011, 2012; Rumpho et al., 2011; Dionísio et al., 2013; Fan et al., 2014), при этом стоит отметить, что условия их культивирования описаны недостаточно полно для воспроизведения полученных результатов другими авторами. Их анализ показывает, что никому из указанных выше авторов не удалось непрерывное культивирование особей от яйца до яйца, хотя, несомненно, они проследили развитие определенных стадий развития.

Наши исследования видов *E. atroviridis*, *E. nigrocapitata* и *P. babai* показывают, что особи размножались не по достижении определенного возраста, а по достижении определенных размеров тела, позволяющих им формировать и откладывать жизнеспособные яйца. Это было возможно только тогда, когда они обильно питались макроводорослевым кормом определенного состава. Мы провели наблюдения за развитием планктотрофных велигеров и личинок из кладок яиц указанных моллюсков. Для велигеров экспериментальным путем был подобран водорослевый корм –

планктонные зеленые микроводоросли *Isochrysis galbana* и *Tetraselmis suecica*. Однако после 20–25 дней развития они перестали есть микроводоросли, и попытки пересадить их на другой корм, состоящий из различных микро- или макроводорослей, для прохождения дальнейших стадий развития оказались неудачными. Наблюдения за развитием личинок из кладок яиц указанных моллюсков показали, что водорослевые хлоропласты в желудках эмбрионов отсутствуют, т.е. вертикальная передача хлоропластов материнской особи слизня развивающимся яйцам не имеет места. Последнее наблюдение важно для аргументированности выводов, сделанных в **главе 7**. Полученные нами для *P. babai*, *E. atroviridis* и *E. nigrocapitata* сведения по жизненному циклу являются новыми для науки и приближают к решению задачи массового культивирования этих ценных для медицинского использования видов.

Поскольку, как было сказано выше, основным кормом изученных нами заднежаберных моллюсков являются представители родов *Bryopsis*, мы выяснили, как отражается постоянный пресс травоядных сосальщиков на состоянии их популяций. Скорость роста у *Bryopsis* достаточно низкая, и существует асинхронность процессов его выедания моллюсками и вызревания у него гамет и спор. Однако популяции *Bryopsis* способны быстро восстановиться, поскольку в момент травмы материнского растения происходит образование протопластов в морской воде. Наиболее важным этапом в этом сложном цитологическом процессе является агглютинация органелл в протоплазматические сгустки в морской воде (Kim et al., 2001). С этой целью в **главе 5** описаны молекулярные характеристики двух исследованных нами новых лектинов, вовлеченных в процесс агглютинации клеточных компонентов у *Bryopsis plumosa* (**раздел 5.1**). Также описан протомный анализ протопластов и появившихся из них клеток (**раздел 5.2**) и механизмы защиты от спонтанной гибридизации протоплазмы растений разных видов ценоцитных зеленых водорослей (**раздел 5.3**).

Известно, что в процессе сцепления клеток разных организмов или клеток с внеклеточным материалом вовлечены несколько групп молекул, среди которых наиболее изученными являются лектины (Kalthoff, 2001). Оказалось, что у *B. plumosa* лектины вовлечены в процесс агглютинации клеточных компонентов при формировании протопластов *in vitro*. Первый из них, названный нами бриохилином (Bryohealin) (Kim et al., 2006; Yoon et al., 2008; Jung et al., 2010), обладает специфичностью к N-ацетил-D-глюкозамину и N-ацетил-D-галактозамину и является эффективным фитогемагглютинином. Его молекулярная масса равна 53,8 кДа, по своей структуре он является двумерным белком и состоит из двух одинаковых субъединиц, а его изоэлектрическая точка близка к рН 5,6. Бриохилин не принадлежит ни к одной известной в настоящее время группе лектинов, но обладает гомоло-

гичностью (более 40%) с лектинами группы «F» (fucolectins, fucose-binding), найденными у некоторых животных и рыб (рисунок 3). Рекомбинантный бриохилин (rBryohealin) не теряет свою активность.

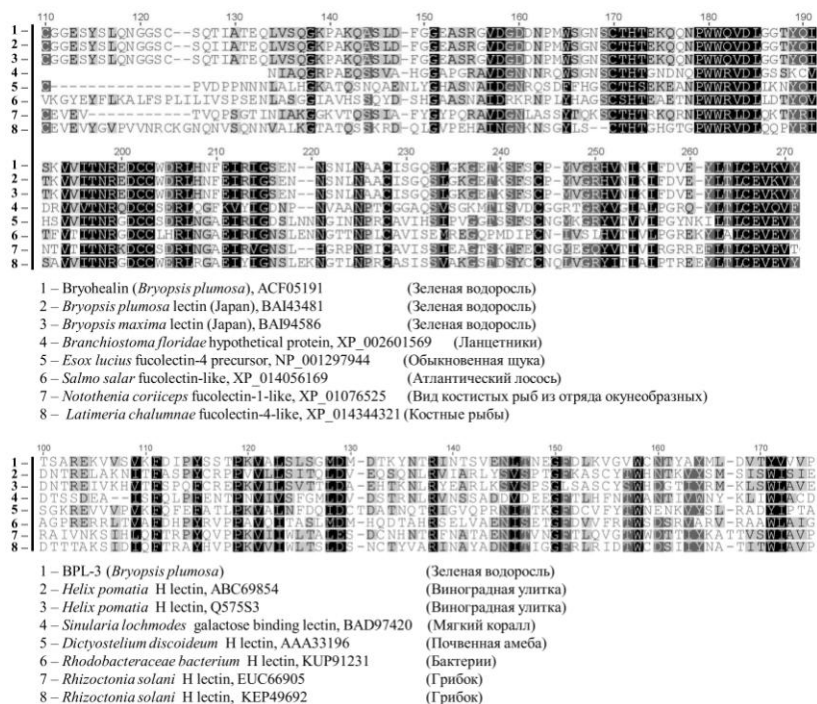


Рисунок 3 – Наиболее гомологичные бриохилину и BPL-3 лектины (поиск по базе данных NCBI). Приводятся совпадающие участки аминокислотной последовательности (со 110-й по 271-ю аминокислоту для бриохилина и с 100-й по 175-ю аминокислоту для BPL-3).

Совпадающие аминокислоты отмечены заливкой символа

Второй выделенный нами лектин – BPL-3 – также обладает специфичностью к N-ацетил-D-глюкозамину и N-ацетил-D-галактозамину, высокой фитогемагглютинативной активностью и термоустойчивостью. Молекулярная масса BPL-3 составляет 11,57 кДа, он является мономерным белком, и его изоэлектрическая точка близка к нейтральной (pH 7,0). Поиск гомологичных белков показал, что BPL-3 также отличается от известных в настоящее время лектинов, включая бриохилин. При этом он обладает гомологичностью от 34,6 до 41,4% с лектинами группы «H» (от *Helix pomatia*), найденными у альционарий и беспозвоночных животных (рисунок 3).

Очищенные бриохилин и BPL-3 эффективно агглютинировали отмытые от жидкого вещества протоплазмы хлоропласты *B. plumosa*, т.е. их функциональная роль является экспериментально подтвержденной.

Эволюционное происхождение этих лектинов представляет большой интерес. Хотя процент их гомологичности с лектинами групп «F» и «H» не очень высокий (в среднем 40%), активные (т.е. белок-кодирующие) участки полностью сохранены. Лектины групп «F» и «H» – животного происхождения, и их предполагаемая функция заключается в распознавании патогенных организмов и иммунном ответе (Koike et al., 2004; Jimbo et al., 2005; Sanchez et al., 2006). Поскольку бриохилин и BPL-3 вовлечены в процесс агглютинации протоплазмы, подобная физиологическая функция была бы не лишней, т.к. протоплазма в морской воде может подвергаться воздействию различных неблагоприятных факторов, в том числе атакам патогенных организмов. В настоящее время существует крайне мало информации по биохимии и структуре водорослевых лектинов, поэтому провести анализ их функциональной и филогенетической принадлежности не представляется возможным. Аминокислотный состав и молекулярная структура бриохилина и BPL-3 отличаются от таковых у лектинов наземных растений, животных и водорослей. Лектины багряннок *Aglaothamnion callophyllidicola* и *Aglaothamnion oosumiense*, выделенные недавно с нашим участием, также не имеют сходства с лектинами наземных растений и водорослей (Han et al., 2012; Shim et al., 2012). Мы предполагаем, что в целом водорослевые лектины могут принадлежать к новому, еще не описанному классу.

Вторым важным этапом в жизни протопластов ценоцитных зеленых водорослей является формирование на поверхности протоплазматического сгустка первичной оболочки и ее постепенное замещение плазматической мембраной. На приведенных в **главе 5** нашей работы трансмиссионных электронных микрофотографиях (**раздел 5.2**) видно, что в первые часы жизни у протопласта *B. plumosa* нет плазматической мембраны, однако к 3-му часу на его поверхности начинают появляться «заплатки» из мембраны, и полностью она формируется в период между 3-м и 12-м часами жизни протопласта. Через 24 ч после истечения протоплазмы в морскую воду на поверхности протопласта появляется клеточная стенка, а через 48 ч с момента вытекания протоплазмы он начинает вести себя как обычная клетка. Таким образом, можно предположить, что на каждом этапе жизни протопласта будет значительно отличаться белковый профиль, поскольку будут синтезироваться какие-то определенные белки, необходимые для прохождения той или иной стадии развития. С этой целью мы изучили экспрессию генов на разных стадиях формирования протопластов, для чего был выполнен их протеомный анализ (**раздел 5.2**).

У *B. plumosa* большинство белков локализовались на 2D-электрофореграммах между изоэлектрическими точками рН 4,2 и 6,1, что значительно ниже, чем у большинства исследованных высших растений. Количество экспрессированных белков увеличивалось с течением времени. Так, в пробе протопластов, подготовленной через 3 ч после их формирования, общее количество зафиксированных белков было на 13% меньше, чем у вегетативных растений (1235 и 1420 белковых точек на геле, соответственно). Затем количество белков стало возрастать, через 12 ч их было уже 1459, а через 24 ч – 1860. На 2D-электрофореграмме появившихся из протопластов клеток (48 ч) было зафиксировано 1915 белковых точек. Некоторые белки были одинаковыми для всех пяти протеомных карт (0, 3, 12, 24, 48 ч), однако в зависимости от стадии развития протопластов или клеток их экспрессия была разной, т.е. более или менее активной.

Анализ показал, что в первые часы жизни протопластов, т.е. 3 ч после формирования, 59,8% диагностированных белков находились в стадии повышенной экспрессии, а в период времени 12 и 24–48 ч было активировано 29,4 и 10,8% таких белков, соответственно. Протеом протопластов через 3–12 ч после формирования практически полностью отличался от протеома появившихся из них клеток, т.е. через 48 ч, поскольку 70–80% белков, зафиксированных в клетках (48 ч), полностью отсутствовали в протопластах (3–12 ч). Таким образом, у *B. plumosa* совокупность экспрессированных белков существенно различается в разные определенные периоды посттравматической трансформации протоплазмы *in vitro* в протопласты, а затем в новые клетки. Безмембранные протопласты, которые фактически являются сгустками протоплазмы, заключенными в полисахаридную оболочку, ведут себя подобно обычным клеткам, и в них осуществляются все необходимые для поддержания жизнедеятельности биохимические реакции, в том числе синтез белков.

Исследователи К. Кобаяши и Ю. Канаизука (Kobayashi, Kanaizuka, 1985) предположили, что в результате смешивания протоплазмы разных видов ценоцитных водорослей можно легко получать межвидовые гибриды. Известно, что у высших растений протопласты разных видов, полученные путем разрушения клеточных стенок гидролитическими ферментами, можно соединить в одной клетке, и в результате получить новое гибридное растение (Gleba, Sytnik, 1984). Мы провели серию экспериментов по гибридизации протоплазмы разных видов сифоновых и сифонокладовых водорослей и внедрению инородного материала в их протопласты (раздел 5.3).

В ходе изучения способности сифоновых и сифонокладовых водорослей формировать *in vitro* гибридные протопласты путем смешивания протоплазмы разных видов нами было установлено, что в естественных условиях морской среды она им не свойственна. Эксперименты по смеси-

ванию протоплазмы разных видов или протоплазмы одного вида с цитозолем другого показали, что некоторые сифонокладовые водоросли обладают избирательной цитотоксичностью и убивают чужую протоплазму. Внедрить чужеродный материал в формирующийся протопласт возможно только принудительно, понизив активность агглютинации в условиях низкого рН морской воды. Однако даже в этом случае инородный материал, будь то синтетические включения, чужие живые органеллы или эукариотические клетки микроводорослей, протопласт извергнет наружу, или же он погибнет. Таким образом, водорослевая протоплазма имеет механизмы защиты от включения в нее чужеродного биологического материала.

Описанные в **главе 5** явления дают ответ на вопрос, *почему* протоплазма ценоцитных зеленых водорослей не гибнет даже внутри клеток моллюсков, и показывают, что именно ее уникальная устойчивость и способность к агглютинации и формированию протопластов лежит в основе клептопластии у моллюсков.

В следующей главе диссертации (**глава 6**) приводится описание строения параподий двух видов «фотосинтетических» элизий, использованных в нашем исследовании, и обсуждаются процессы накопления и использования ими клептопластид. На приведенных в **разделе 6.1** трансмиссионных электронных микрофотографиях видно, что у откормленных особей *Elysia nigrocapitata* параподии образованы несколькими слоями разных по функциям клеток. Дорсальная сторона параподий покрыта ресничками и микроворсинками, а вентральная – только микроворсинками. Под слоем одноядерных эпителиальных клеток располагается слой одноядерных крупных клеток с очень большим структурным элементом, по внешнему виду схожим с вакуолью, поскольку он представляет собой наполненный жидкостью мембранный мешок (рисунок 4.1). В этом слое клеток также находится очень много мелких липидных капель, рассеянных среди вакуольсодержащих клеток (рисунок 4.2). Клетки и липидные капли расположены рыхло, и пространство между ними заполнено гомогенным межклеточным веществом, имеющим консистенцию геля. До настоящего времени у всех изученных видов моллюсков «на солнечных батарейках» никогда не описывался подобный широкий, четко оформленный слой вакуольсодержащих клеток, расположенный под эпителиальной тканью. Возможно, он является видоспецифическим для *E. nigrocapitata*, но нельзя также исключить и того, что при изучении других элизий исследователи не обращали на него внимания, поскольку были сосредоточены на поиске хлоропластсодержащих клеток.

У *E. nigrocapitata* слой клеток, включающих хлоропласты (т.е. клептопластиды), располагается непосредственно под слоем вакуольсодержащих клеток. Эти типы клеток никогда не перемешиваются между собой. Между хлоропластсодержащими клетками встречаются редкие клетки, целиком

заполненные липидными каплями. Хлоропластосодержащие клетки распространены абсолютно под всей поверхностью параподий, за исключением тонкой светлой полосы, расположенной на границе вентральной и дорсальной сторон. У *E. nigrocapitata* такие клетки содержат 3–10 (15) хлоропластов, многочисленные митохондрии и несколько ядер. Так, на срезе одной клетки мы видели три ядра, но допускаем, что во всем ее объеме их больше. Морфология ядер в клетках этого типа не отличается от таковой у других описанных выше клеток. Многие хлоропласты окружены эндоплазматической сетью с рибосомами (далее по тексту ЭР), но не всегда в непосредственной близости с ними находится ядро (рисунок 5).

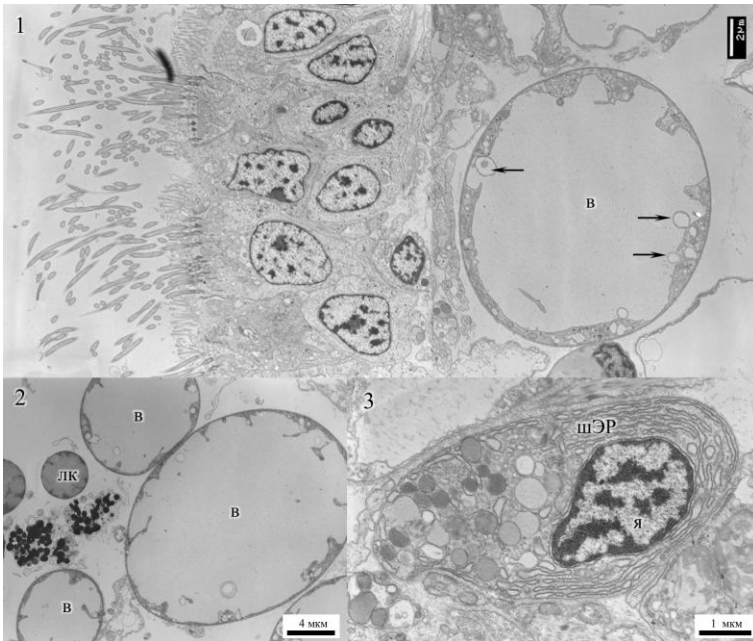


Рисунок 4 – Микрофотографии цитологического строения *Elysia nigrocapitata*. Под слоем эпителиальных клеток располагается слой крупных одноядерных клеток с большой вакуольподобной органеллой.

- 1 – мелкие везикулы внутри этих вакуолей показаны стрелками;
 2 – размеры клеток с вакуолями различны; 3 – иногда в этом пласте клеток присутствуют одноядерные клетки другого типа, с хорошо различимой сетью шЭР; в – вакуольподобная органелла, лк – липидная капля, шЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум, я – ядро

Изучение срезов тканей особей *E. nigrocapitata*, перенесших голодание в течение пяти месяцев, показало, что у них отсутствуют хорошо оформ-

ленные, дифференцированные слои вакуоль- и хлоропластсодержащих клеток. В течение первых двух месяцев полного голодания все особи утратили зеленую окраску, следовательно, в числе первых были утилизированы все хлоропластсодержащие клетки. Вслед за этим стали расходоваться вакуольсодержащие клетки, внутриклеточные и находящиеся в межклеточном веществе липидные капли. К пятому месяцу голодания это привело к 93–97%-й потере животными веса и размеров. В тканях голодных особей мы не обнаружили ни одной многоядерной клетки, что дает основание предполагать, что многочисленные ядра и сеть шероховатого ЭР, окружающая хлоропласты в пищеварительных клетках откормленных особей (рисунок 5), были не животного, а растительного происхождения. Отсутствие в папиллах моллюсков, перенесших длительное голодание, вакуольсодержащих клеток и свободных липидных капель указывает на то, что они тоже являются запасным питательным материалом, способствующим выживанию *E. nigrocapitata* в условиях длительного голодания.

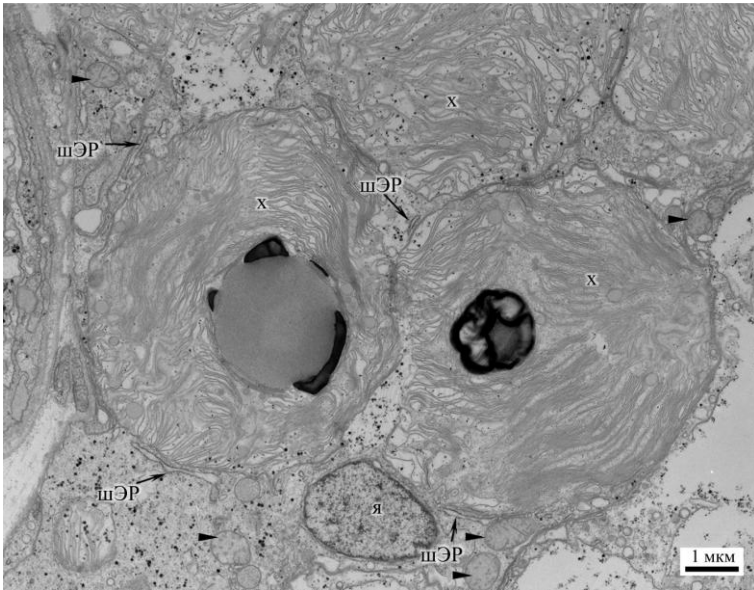


Рисунок 5 – Увеличенный фрагмент пищеварительной клетки *Elysia nigrocapitata* с неповрежденными хлоропластами *Chaetomorpha moniligera*. х – неповрежденный хлоропласт, шЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум (стрелки), я – ядро, черные укороченные стрелки – митохондрии

Изучение срезов параподий второго «фотосинтетического» моллюска, *Elysia atroviridis* (раздел 6.2), показало, что дорсальная и вентральная сто-

роны его параподий также покрыты ресничками и микроворсинками, поверх которых лежит толстый слой слизи. У *E. atroviridis* хлоропластсодержащие клетки располагаются непосредственно под эпителием. Слой одноядерных вакуольсодержащих клеток у этого моллюска отсутствует. В слое хлоропластсодержащих клеток имеются свободные, очень крупные липидные капли и одноядерные клетки с хорошо развитой сетью шероховатого эндоплазматического ретикулума, без хлоропластов. Эта сеть всегда располагается около ядра, ее цистерны покрыты многочисленными, хорошо различимыми рибосомами. Она очень заметно отличается от фрагментов тонкой эндоплазматической сети, находящейся в хлоропластсодержащих клетках рядом с ассимилированными клептопластидами.

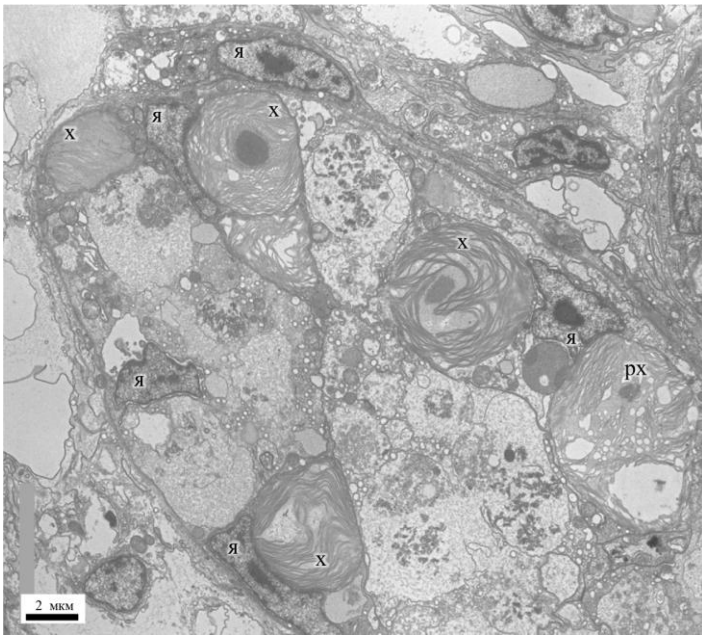


Рисунок 6 – Увеличенный фрагмент пищеварительной клетки *Elysia atroviridis* с неповрежденными хлоропластами *Bryopsis plumosa*. В пищеварительных клетках находится много ядер, которые, как правило, локализируются рядом с клептопластидами. рх – разрушающийся хлоропласт, х – неповрежденный хлоропласт, я – ядро

Хлоропластсодержащие клетки распределяются абсолютно под всей поверхностью параподий, исключая светлую полосу на границе перехода между вентральной и дорсальной сторонам. В этих клетках, как правило, находится несколько разрозненных пищеварительных люменов, зани-

мающих центральное положение, и большое количество аутолизосом. Хотя большинство хлоропластов *B. plumosa* сохраняются внутри клеток *E. atroviridis* в живом функциональном состоянии, какое-то их количество подвергается постепенному перевариванию. В исследованных нами клетках неповрежденными были около 80% хлоропластов. У них отчетливо просматривался матрикс пиреноида, уложенные в стопки тилакоиды и пластоглобулы, ламеллы тилакоидов при этом были несколько разбухшими. В непосредственной близости от многих хлоропластов и ядер просматривались фрагменты шероховатой эндоплазматической сети, более тонкой, чем на срезах клеток *E. atroviridis* иного типа.

Все пищеварительные клетки *E. atroviridis* включали множественные хлоропласты, митохондрии и ядра. Так, на срезе одной клетки мы видели 9 хлоропластов и 7 ядер и полагаем, что во всем ее объеме их должно быть еще больше. Ядра находились рядом с хлоропластами или даже примыкали к ним, но между ними всегда была тонкая прослойка цитоплазмы, и их мембраны вплотную не соприкасались (рисунок б).

До настоящего времени не установлено, каким образом хлоропласты водорослей проникают в клетки моллюсков. В статье М. Рамфо с соавторами (Rumpho et al., 2011) сказано, что они попадают из кишечника в пищеварительные эпителиальные клетки посредством фагоцитоза, но экспериментально это не было доказано. Мы затрудняемся сказать, заключены ли клептопластиды у исследованных нами элизий в цитопласт и/или фагосому. У обоих видов моллюсков в цитоплазме хлоропластсодержащих клеток встречаются множественные мембраны. В одних случаях они окружают хлоропласты и находящиеся рядом с ними митохондрии, в других такие агрегации отсутствуют и хлоропласты находятся в цитоплазме животных клеток без дополнительной мембранной обертки или же бывают окружены сетью шероховатого ЭР. У наших элизий многочисленные ядра и клептопластиды никогда не были разделены между собой фагоцитарными мембранами, хотя если бы происходило выборочное поглощение клетками только хлоропластов, то последние были бы заключены в фагосому отдельно от ядер животной клетки, поскольку смысла заключать собственные ядра в фагосому нет. Поэтому мы полагаем, что пищеварительные клетки моллюсков «захватывают» не отдельные хлоропласты, а сгустки водорослевой протоплазмы, включающие все клеточные компоненты, в том числе ядра и хлоропласты, окруженные сетью шероховатого ЭР. В основе этого лежит выраженная способность к агглютинации органелл у ценоцитных зеленых водорослей, протоплазма которых всегда вытекает из поврежденной клетки-сифона в виде сгустков. Способность протоплазмы изученных нами видов ценоцитных зеленых водорослей к автономному существованию внутри клеток моллюска обеспечивает способность к длительному голоданию у элизий.

В заключительной главе диссертации (глава 7) приводятся рассуждения о механизмах формирования симбиотических связей между ценоцитными зелеными водорослями и заднежаберными моллюсками.

Как показали наши исследования, *Placida babai* осуществляет кратковременный захват клептопластид, в то же время именно она в наибольшей степени способствует высокому уровню воспроизводства поедаемого ею *Bryopsis*. Находясь внутри тела *P. babai*, клептопластиды *Bryopsis* частично утрачивают способность к активному фотосинтезу, однако при этом они сохраняют свою структурную целостность. Мы полагаем, что *P. babai* не нуждается в длительной консервации клептопластид, поскольку, во-первых, это быстрорастущий короткоцикловый вид, во-вторых, перед каждым откладыванием яиц моллюск должен обильно поесть. Тем не менее клептопластиды *Bryopsis* остаются живыми в теле плациды и в течение нескольких дней не теряют способность к фотосинтезу, при этом они всегда лучше сохраняют свою функциональность в условиях темноты.

Моллюск *Elysia atroviridis* накапливает неповрежденные хлоропласты *Bryopsis* в клетках своей пищеварительной системы. Он способен пережить голодание в течение почти трех месяцев, потеря его массы при этом около 30%. У *E. atroviridis* в условиях полной темноты клептопластиды *Bryopsis* не утрачивают способность к активному фотосинтезу в течение длительного времени, однако в условиях яркого дневного света (220–450 $\mu\text{моль фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) клептопластиды разрушались значительно быстрее, т.е. их функциональность можно охарактеризовать как «долговременную» в условиях полной темноты (0 $\mu\text{моль фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) и «кратковременную» в условиях освещенности (220–450 $\mu\text{моль фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) (рисунок 7).

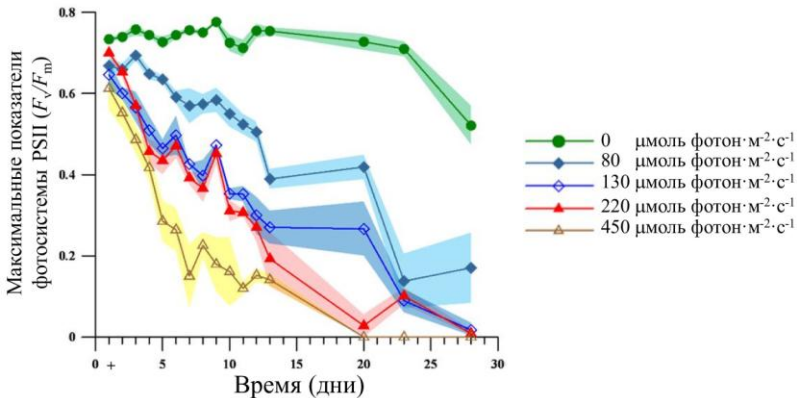


Рисунок 7 – Влияние разного уровня света и полной темноты на фотосинтетическую активность клептопластид *Bryopsis plumosa* внутри пароподий *Elysia atroviridis* после начала голодания

Что касается *Elysia nigrocapitata*, клептопластиды разных видов ценоцитных зеленых водорослей в ее теле обладали неодинаковой фотосинтетической активностью. Самыми «неактивными» клептопластидами были хлоропласты *Phyllocladion orientale*, а наиболее «активными» – клептопластиды *Chaetomorpha moniligera*. При этом стоит отметить, что, питаясь *C. moniligera*, особи становились наиболее крупными (3 см в длину), но жили по 3–8 месяцев, а питаясь *P. orientale*, особи были мелкими (3–5 мм в длину), но жили по 12–14 месяцев. Фотосинтетическая активность клептопластид от *Cladophora sakaii* и *Bryopsis plumosa* – основной пищи этого моллюска в природе, в условиях тусклого света ($40 \mu\text{моль фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) была приблизительно одинаковой. Все же при подаче смешанного корма, состоящего из двух этих водорослей, особи *E. nigrocapitata* всегда отдавали предпочтение *C. sakaii*. В целом наши исследования показывают, что у моллюска *E. nigrocapitata* функциональность клептопластид также сохраняется дольше в условиях полной темноты, чем в условиях освещенности.

До наших исследований при лабораторном содержании заднежаберных моллюсков все исследователи в качестве корма изучаемого ими вида использовали только одну выбранную ими водоросль. Определенная в ходе экспериментов активность клептопластид при этом всегда оценивалась как видоспецифическая. Мы в своем исследовании впервые показали, что она определяется видовой принадлежностью клептопластид. Кроме того, мы впервые показали, что продолжительность жизни, размерные характеристики и способность к размножению у моллюсков напрямую зависят от состава водорослевого корма. Такая реакция организма на разный корм представляется нам вполне успешным механизмом адаптации к постоянно изменяющимся условиям среды. Моллюскам необходим разнообразный макроводорослевый корм, питаясь которым они могли бы регулировать свое физиологическое состояние и тем самым управлять физиологическими процессами и «временем» своей жизни.

За прошедшие годы явление клептопластии у моллюсков в научно-популярной литературе уже обросло мифами, в которых тесно переплелись некоторые домыслы ученых с компиляциями и фантазиями популяризаторов научных знаний. Так, широко распространено мнение, что когда включается процесс фотосинтеза клептопластид, моллюски переходят на «растительный» образ жизни, подпитываясь солнечной энергией, а если они долгое время находятся в темноте, то клептопластиды погибают, и моллюски снова переходят к гетеротрофному питанию, пополняя запасы хлоропластов. Наши исследования показывают прямо противоположное: именно находясь на свету, клептопластиды всегда нестабильны и демонстрируют значительное уменьшение своей фотосинтетической активности всего за несколько дней. Это обсуждалось и в работах других авторов (Evertsen, Johnsen, 2009; Händeler et al., 2009; Vieira et al., 2009; Serôdio et al., 2010). При этом отметим,

что в природных условиях яркий дневной свет часто превышает $2000 \mu\text{моль фотон}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, т.е. он в 10–50 раз больше того, что протестировали мы. Исходя из этого, можно предположить, что в природе, находясь на свету, клептопластиды не способны к длительному функционированию, и животным регулярно потребуется корм, поскольку энергии, полученной в ходе световой реакции фотосинтеза, для сохранения их жизнеспособности в течение многих месяцев явно не хватит. К тому же следует добавить, что наряду с глюкозой, клетки моллюска в большом количестве получают и другой продукт фотосинтеза клептопластид – кислород, который, как известно, является мощным окислителем. Следует предположить, что солнечные ванны моллюскам не полезны, и они, напротив, должны укрываться от яркого солнечного света.

Питание «фотосинтетических» моллюсков только глюкозой не может обеспечить их многомесячное полноценное существование и воспроизводство, поскольку во время голодания у них происходит значительное уменьшение размеров тела. В своей статье по *E. nigrocapitata* мы впервые подробно обсудили это явление и его причину (Klochkova et al., 2013). После выхода процитированной выше статьи в научной литературе стал регулярно подниматься вопрос, который мы впервые рассмотрели в статье по *E. nigrocapitata*: насколько велика роль клептопластид в выживании фотосинтетических моллюсков (de Vries et al., 2014a,b, 2015). Мы однозначно считаем, что она во многом преувеличена и жизнь моллюсков поддерживается не только за счет фотосинтеза клептопластид, но и иным способом. Таким образом, исключительная фотосинтетическая роль клептопластид в выживании «фотосинтетических» моллюсков была до некоторой степени преувеличена, и выводы, сделанные на основе наблюдений за *E. chlorotica* (Mujer et al., 1996; Pierce et al., 1996; Rumpho et al., 2011), нельзя распространять на все «фотосинтетические» моллюски. Мы полагаем, что у каждого вида моллюсков, способных поедать разные водоросли, имеются «свои» максимально эффективные клептопластиды определенных видов растений. Их-то они и предпочитают всем другим. В этом смысле можно говорить о существовании наиболее эффективных межвидовых симбиотических ассоциаций водоросль-моллюск и основной стратегии питания, направленной на накопление в пищеварительных клетках моллюсков как можно большего количества неповрежденных хлоропластов для их длительного резервирования в качестве запасных веществ и постепенного использования в ходе голодания.

В течение двух десятилетий исследователи пытались найти ответ на вопрос, как ассимилированные в клетки моллюсков хлоропласты продолжают функционировать недели и даже месяцы при полном отсутствии водорослевых ядер и эндоплазматической сети с рибосомами, которые, как предполагалось, попадая в клетки животных, перевариваются. Но действительно ли это так? Наши цитологические исследования показали, что в тканях *E. nigrocapitata*, прошедшей длительное голодание, отсутствуют мно-

гоядерные клетки. Мы считаем, что многочисленные ядра и сеть ЭР, окружающая хлоропласты в пищеварительных клетках откормленных особей, были растительного, а не животного происхождения. Как показано на рисунке 5, фрагменты тонкой эндоплазматической сети, расположенные вблизи хлоропластов, отличаются от ЭР, свойственного другим типам клеток элизий. Последняя очень отчетливо видна на ультратонких срезах, она всегда обширная, с многочисленными рибосомами, находится в непосредственной близости от ядра клетки (рисунок 4.3).

Транскриптомный анализ *E. chlorotica* поставил под сомнение гипотезу ГПП от водорослей к моллюскам, поскольку в транскриптах этого животного не было найдено ни одного белка, кодируемого ядерным геномом клетки водорослей (Pelletreau et al., 2011; Rumpho et al., 2011). Тем не менее у этого моллюска было обнаружено несколько транскриптов хлоропластов водоросли *Vaucheria litorea*, однако среди них не было ни одного гена, непосредственно регулирующего фотосинтез (Pelletreau et al., 2011). Затем группа немецких ученых высказала свое независимое мнение, что у «фотосинтетических» моллюсков *Elysia timida* и *Plakobrachus ocellatus* также не имел места ГПП, поддерживающих жизнедеятельность ассимилированных клептопластид (Wägele et al., 2011).

Наши анализы также показали, что в транскриптомах моллюсков *Placida babai* и *Elysia nigrocapitata* нет ни одного гена, непосредственно регулирующего фотосинтез (раздел 7.4). Для *P. babai* это был вполне закономерный результат, поскольку, как показали наши исследования, этот моллюск не накапливает функционирующие клептопластиды для их долговременного использования. У *E. nigrocapitata*, напротив, клептопластиды продолжают функционировать достаточно длительное время, особенно при слабом свете или в темноте. Но и в ее транскриптоме не оказалось генов, регулирующих фотосинтез.

В транскриптоме моллюска *Elysia atroviridis* мы нашли семь потенциальных кандидатов генов, кодируемых геномом хлоропласта (таблица 1). В настоящее время мы не можем сказать точно, было ли их нахождение результатом загрязнения мРНК моллюска фрагментами мРНК хлоропластов *Bryopsis plumosa*, которым он питался в природе и лаборатории, или же у него на самом деле есть собственные «фотосинтетические» гены. В ходе экспериментов мы старались максимально исключить любую возможность перекрестного загрязнения проб животного и растительного происхождения. Для выделения мРНК мы использовали отложенные кладки яиц, тщательно продезинфицированные в сериях растворов H_2O_2 и 3%-м растворе соляной кислоты (3 раза, с интервалом в 1 день), для исключения вероятности присутствия на их поверхности водорослевых хлоропластов. Во время такой дезинфекции мембраны хлоропластов полностью разрушаются, в то время как яйца остаются неповрежденными, т.к. они защищены плотным слизистым чехлом. Внутри яиц хлоропластов

нет, поскольку не существует их вертикального переноса от материнской особи к личинкам. Таким образом, мы не исключаем вероятность того, что обнаруженные нами «фотосинтетические» гены действительно находятся в ядерном геноме *E. atroviridis*. Эти результаты дают основание считать, что как выдвигание (Rumpho et al., 2000, 2001), так и полное опровержение гипотезы ГПГ от водорослей к моллюскам (Bhattacharya et al., 2013) после первой же проверки транскриптомов следует считать преждевременным.

Таблица 1

Количество повторяющихся ридов генов, имеющих сходство, в транскриптомах исследованных заднежаберных моллюсков и зеленой водоросли *Bryopsis plumosa*

<i>Placida babai</i>	<i>Elysia atroviridis</i>	<i>Elysia nigrocapitata</i>	<i>Bryopsis plumosa</i>	Название в соответствии с базой данных NCBI	Локализация
0	26	0	616	PSII RC D1 protein (psbA)	Хлоропласт
0	24	0	68	PSII 44 kDa (CP43) (psbC)	Хлоропласт
0	15	0	13	PSII RC ycf12	Хлоропласт
0	14	0	66	β -tubulin	Ядро
0	5	0	54	rbcL	Хлоропласт
0	5	0	26	ATP synthase	Хлоропласт
0	4	0	74	PSI P700 apoprotein A2 (psaB)	Хлоропласт
0	4	0	492	β -tubulin	Ядро
0	4	0	64	PSII 47 kDa protein (psbC)	Хлоропласт
13	3	0	121	β -tubulin	Ядро
5	2	0	416	Polyubiquitin	Неизвестно
<i>Итого «фотосинтетических» генов</i>					
0	7	0			

Примечание – «Фотосинтетические» гены отмечены в таблице заливкой строки.

По разным причинам ответ на данный вопрос едва ли будет получен в ближайшее время. Пока результаты изучения цитологического строения клеток пищеварительной системы заднежаберных моллюсков и особенностей преобразования *in vitro* цитоплазмы ценоцитных зеленых водорослей, которыми питаются эти моллюски, дают основание говорить о том, что моллюски захватывают в свои клетки не отдельные хлоропласты, а сгустки водорослевой протоплазмы, в которых присутствуют все собственные растительной клетке органеллы. Если наши предположения верны, и важнейшие клеточные компоненты растительной клетки – ядра, ЭР и хлоропласты – остаются живыми и функциональными в пищеварительных клетках моллюсков, то регуляция фотосинтеза хлоропластид может обеспечиваться за счет функционирования ядра растительной клетки.

Подводя итог обсуждению материалов, отметим, что наше исследование расширяет представления о межвидовом сотрудничестве, как элементе единства и целостности живой природы. Механизмы взаимовыгодного сожительства ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков складывались, судя по всему, по мере их параллельного исторического развития, а их формирование, безусловно, способствовало сохранению видов-симбионтов.

ВЫВОДЫ

1. В ходе изучения распространения, экологии, сезонного развития в природной среде, а также особенностей протекания в лабораторных условиях жизненных циклов у 24 видов зеленых ценоцитных водорослей и 7 видов заднежаберных моллюсков были выбраны наиболее удобные объекты исследования. Ими оказались три вида моллюсков, способных к клептопластии и 10 видов активно поедаемых ими ценоцитных зеленых водорослей. Подобраны условия их содержания в лабораторных культурах, методы управления скоростью прохождения разных этапов развития, интенсивностью продукционных процессов.

2. Моллюскам *Placida babai*, *Elysia atroviridis* и *E. nigrocapitata* свойственна высокая пищевая привязанность к определенному виду водорослевого корма. Лишь отдельные представители вида в редких случаях способны менять его после длительного голодания, большинство же моллюсков погибают, но не переходят на новый вид корма. Размножение у изученных видов определяется не столько возрастом особей, сколько их размерно-массовыми показателями, позволяющими взрослым особям откладывать жизнеспособные яйца. Использование водорослевого корма, способствующего или, наоборот, замедляющего рост животных, позволяет им регулировать время откладки яиц в соответствии с температурным режимом и кормовой базой.

3. Наблюдения в природе и лабораторных культурах показывают, что *P. babai* является короткоцикловым эфемером и живет в природе 1–2 месяца; его популяции представлены перекрывающимися во времени генерациями. *E. nigrocapitata* – однолетний вид, способный выдерживать длительное, до пяти месяцев, голодание. Редукция размеров и массы ее особей при этом достигает 93–97%. *E. atroviridis* также однолетний вид, способный голодать около трех месяцев. Уменьшение ее размерно-массовых показателей при этом составляет не более 30%.

4. Лектины бриохилин и BPL-3, задействованные в агглютинации клеточных компонентов водоросли *Bryopsis plumosa* при формировании протопластов, являются новыми для науки фитогемагглютининами и могут принадлежать к новому, еще не описанному классу лектинов. Рекомбинантный бриохилин (rBryohealin) не теряет свою активность. В естественных условиях зеленым ценоцитным водорослям несвойственно

формирование гибридных протопластов, и внедрить чужеродный материал в формирующийся протопласт возможно только принудительно, но даже в этом случае он будет извергнут наружу, или протопласт погибнет. Безмембранные протопласты ведут себя подобно обычным клеткам, синтезируя большое количество различных белков для поддержания своей жизнедеятельности.

5. Морфологические характеристики, использовавшиеся в систематике изученных моллюсков как устойчивые диагностические признаки, такими не являются и подвержены значительной изменчивости в зависимости от условий содержания животных, состава их водорослевого корма и режима кормления. У *E. nigrocapitata* условия содержания отражаются на окраске тела, его размерах, наличии и цвете пятна на шее, полосы по краю пароподий. У *P. babai*, перенесшей голодание, меняются форма тела, длина и густота папилл. У *E. atroviridis* условия содержания и режим кормления не вызывают особых изменений диагностических признаков, связанных с окраской тела. У особей моллюсков из разных популяций при полном совпадении морфологии образцов может существовать довольно значительная генетическая разница.

6. У откормленных особей *E. nigrocapitata* под эпителиальной тканью находится обширный слой вакуольсодержащих клеток и липидных капель; слой хлоропластсодержащих (пищеварительных) клеток располагается под ним; у особей, переживших пятимесячное голодание и потерявших 93–97% исходного веса, оба эти слоя отсутствуют. У *E. atroviridis* слой вакуольсодержащих клеток и липидных капель отсутствует; одиночные клетки этого типа иногда встречаются среди хлоропластсодержащих клеток. Наличие клеток, резервирующих большое количество энергоемких питательных веществ, обеспечивает представителям этих видов способность к длительному голоданию. Пищеварительные клетки моллюсков «захватывают» не отдельные хлоропласты, как считалось раньше, а протоплазматические сгустки водорослевой протоплазмы, включающие все клеточные компоненты, в том числе ядра и хлоропласты, обычно окруженные сетью шероховатого ЭР. Эта способность лежит в основе симбиотических связей моллюсков и водорослей на субклеточном уровне. Растительная природа множества ядер, встречающихся в пищеварительных клетках моллюсков, подтверждается их отсутствием после длительного голодания животных.

7. У заднежаберных моллюсков фотосинтетическая активность ассимилированных клептопластид определяется видовой принадлежностью ценоцитных зеленых водорослей, от которых они были получены. У *P. babai* клептопластиды *Bryopsis* частично утрачивают способность к активному фотосинтезу, однако сохраняют свою структурную целостность. У *E. atroviridis* функциональность клептопластид *Bryopsis* является «долговременной» в условиях полной темноты и «кратковременной» в условиях освещенности. У *E. nigrocapitata* в зависимости от вида погло-

щаемых водорослей осуществляется кратковременный или долговременный захват клептопластид; их функциональность также сохраняется дольше в условиях полной темноты.

8. В транскриптомах моллюсков *P. babai* и *E. nigrocapitata* нет ни одного гена, непосредственно регулирующего фотосинтез. В транскриптоме моллюска *E. atroviridis* найдено несколько потенциальных кандидатов генов, кодируемых геномом хлоропласта, но их количества явно не достаточно для регуляции фотосинтеза клептопластид. Определение их функциональной роли в симбиотической ассоциации моллюск-водоросль, на субклеточном уровне взаимодействия, требует проведения отдельного глубокого исследования.

Список основных публикаций по материалам диссертации

Международные рецензируемые научные журналы, зарегистрированные в базах данных Scopus (Elsevier) и Thomson Reuters, и российские рецензируемые научные журналы – издания, рекомендованные ВАК РФ:

1. **Klochkova, T.A.** Experimental hybridization between some marine coenocytic green algae using protoplasts extruded *in vitro* / T.A. Klochkova, K.-S. Yoon, J.A. West, G.H. Kim // *Algae*. 2005. Vol. 20. P. 239–249.
2. Kim, G.H. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) / G.H. Kim, **T.A. Klochkova**, K.-S. Yoon, K.P. Lee // *Journal of Phycology*. 2006. Vol. 42. P. 86–95.
3. Yoon, K.-S. Molecular characterization of the lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) / K.-S. Yoon, K.P. Lee, **T.A. Klochkova**, G.H. Kim // *Journal of Phycology*. 2008. Vol. 44. P. 103–112.
4. **Klochkova, T.A.** Interactions between marine facultative epiphyte *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadales, Chlorophyta) and ceramiacean algae (Rhodophyta) / **T.A. Klochkova**, G.-Y. Cho, S.M. Boo, K.W. Chung, S. Kim, G.H. Kim // *Journal of Environmental Biology*, special issue “Marine Environmental Biology”. 2008. Vol. 29. P. 427–435.
5. **Klochkova, T.A.** Feeding specificity and photosynthetic activity of Korean sacoglossan mollusks / T.A. Klochkova, J.W. Han, J.H. Kim, K.Y. Kim, G.H. Kim // *Algae*. 2010. Vol. 25. P. 217–227.
6. Jung, M.G. Characterization of carbohydrate combining sites of Bryohealin, an algal lectin from *Bryopsis plumosa* / M.G. Jung, K.P. Lee, H.-G. Choi, S.-H. Kang, **T.A. Klochkova**, J.W. Han, G.H. Kim // *Journal of Applied Phycology*. 2010. Vol. 22. P. 793–802.
7. Han, J.W. Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa* / J.W. Han, K.S. Yoon, **T.A. Klochkova**, M.-S. Hwang, G.H. Kim // *Journal of Applied Phycology*. 2011. Vol. 23. P. 745–753.

8. Shim, E. Purification of a sex-specific lectin involved in gamete binding of *Aglaothamnion callophyllidicola* (Rhodophyta) / E. Shim, J.B. Shim, **T.A. Klochkova**, J.W. Han, G.H. Kim // Journal of Phycology. 2012. Vol. 48. P. 916–924.
9. Han, J.W. Isolation and characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga *Aglaothamnion oosumiense* Itono / J.W. Han, **T.A. Klochkova**, J.B. Shim, K. Yoon, G.H. Kim // Applied and Environmental Microbiology. 2012. Vol. 78. P. 7283–7289.
10. **Klochkova, T.A.** Morphology, molecular phylogeny and photosynthetic activity of the sacoglossan mollusk, *Elysia nigrocapitata*, from Korea / T.A. Klochkova, J.W. Han, K.-H. Chah, J.-H. Kim, K.Y. Kim, G.H. Kim // Marine Biology. 2013. Vol. 160. P. 155–168.
11. Han, J.H. Transcriptome analysis of the short-term photosynthetic sea slug *Placida dendritica* / J.H. Han, **T.A. Klochkova**, J.W. Han, J. Shim, G.H. Kim // Algae. 2015. Vol. 30. P. 303–312.
12. **Klochkova, T.A.** Proteomic profiles and ultrastructure of regenerating protoplast of *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) / **T.A. Klochkova**, M.S. Kwak, G.H. Kim // Algae. 2016. Vol. 31. P. 379–390.
13. **Клочкова, Т.А.** Старение и патогистологические изменения клеток у представителей рода морских заднежаберных моллюсков *Elysia Risso*, 1818 / **Клочкова, Т.А.**, Ким, Г.Х. // Вестник Камчатского государственного технического университета [Bulletin of Kamchatka State Technical University]. 2016. № 38. С. 63–73. DOI: 10.17217/2079-0333-2016-38-63-73.
14. **Клочкова, Т.А.** Обзор явления клетопластики у морских заднежаберных моллюсков / **Клочкова, Т.А.** // Вестник Камчатского государственного технического университета [Bulletin of Kamchatka State Technical University]. 2016. № 37. С. 57–69. DOI: 10.17217/2079-0333-2016-37-57-69.

Публикации в других изданиях:

15. Kim, G.H. Development of the protoplasts induced from wound-response in fifteen marine green algae / G.H. Kim, **T.A. Klochkova** // Japanese Journal of Phycology. 2004. Vol. 52(Supplement). P. 111–116.

Коллективная монография:

16. Bae, E.H. Algal Flora of Korea. Series «Flora and Fauna of Korea» / E.H. Bae, H.-S. Kim, C.-J. Kwon, I.-K. Hwang, G.H. Kim, **T.A. Klochkova** // National Institute of Biological Resources, Ministry of Environment. 2010. Vol. 1, №. 1. 218 P. (G.H. Kim, **T.A. Klochkova** «Bryopsidales». P. 157–209).

Клочкова Татьяна Андреевна

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ
СВЯЗЕЙ И СТРАТЕГИЯ СОВМЕСТНОГО ВЫЖИВАНИЯ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МОРСКИХ ЦЕНОЦИТНЫХ ЗЕЛЕННЫХ
ВОДОРΟΣЛЕЙ И ЗАДНЕЖАБЕРНЫХ МОЛЛЮСКОВ**

*Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук*

В авторской редакции
Технический редактор О.А. Лыгина
Набор текста Т.А. Клочкова
Верстка, оригинал-макет О.А. Лыгина

Подписано в печать 06.02.2017 г.
Формат 60*84/16. Печать цифровая. Гарнитура TimesNewRoman
Авт. л. 2,52. Уч.-изд. л. 2,67 Усл. печ. л. 2,09
Тираж 100 экз. Заказ № 2

Издательство
Камчатского государственного технического университета
Отпечатано участком оперативной полиграфии издательства КамчатГТУ
683003, г. Петропавловск-Камчатский, ул. Ключевская, 35