

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Клочковой Татьяны Андреевны

«Механизмы формирования симбиотических связей и стратегия совместного выживания некоторых видов морских ценоцитных

зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков»,

представленную на соискание ученой степени

доктора биологических наук по специальности

03.02.08 - Экология (биологические науки)

Диссертационная работа ***Клочковой Татьяны Андреевны*** – это многогранное обобщение результатов многолетних исследований симбиотических ассоциаций между несколькими разными видами заднежаберных моллюсков и зеленых ценоцитных водорослей.

Автор затронул один из важнейших эволюционных процессов – симбиоз. При этом не всегда однозначные симбиотические отношения между этими во многом уникальными и необычными организмами изучены на разных уровнях организации живых систем, включая субклеточный. Такого рода экологические исследования пока достаточно редки не только в нашей стране, но и за рубежом.

Стоит отметить, что именно изучение таких симбиотических ассоциаций заднежаберный моллюск – ценоцитная ваушериевая водоросль привело к появлению широко растиражированной в современной биологической науке теории горизонтального переноса генов. Эта теория казалось бы открывала, прошу прощения за тавтологию, новые горизонты в понимании механизмов эволюции и происхождения видов, но совсем недавно, в 2013 г. ее авторы пересмотрели ее, так как появились новые данные. Таким образом, исследование механизмов такого уникального явления, как сосуществование в одной клетке органелл, принадлежащих представителям разных и далеких в филогенетическом отношении видов зашло в тупик, и вопрос о том как на молекулярном уровне обеспечивается функциональность клептопластид остался открытым. Решению этой сложной и весьма актуальной для дальнейшего развития экологии задачи посвящена данная работа.

Крайне важный аспект, затронутый в работе, – роль плазматической мембраны в жизни клетки. Оказывается, плазмалемма не на столько и нужна. Это позволяет заглянуть в самое начало жизни на Земле, в её первые шаги.

Наряду с большим научным значением диссертация Татьяны Андреевны имеет важную практическую направленность, поскольку в значительной степени продвигает исследования в области культивирования ценных для производства лекарственных препаратов моллюском и выявления химических соединений, способствующих «ранозаживлению» плазматических мембран.

Рецензируемая диссертационная работа представляет собой рукопись объемом 224 страницы, включая список литературы, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов. Список литературы включает 245 публикаций, из которых 209 иностранные публикации. Иллюстративный материал представлен 56 рисунками и 9 таблицами. В работе представлены все нормативные разделы, регламентированные требованиями к оформлению докторских диссертаций. Структура работы четкая и логичная, пронизана единством, что делает всю работу единым научным произведением.

Во введении представлена общая характеристика диссертации. Здесь дается описание актуальности, представлена цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость и методология работы, выдвинуты выносимые на защиту положения, дана информация по другим необходимым для квалификационных работ разделам. На защиту вынесены 4 положения, которые отражают основные научные достижения диссертантки. В последнем из них она утверждает, что сложные и многогранные взаимоотношения между изученными видами взаимовыгодны и неразрывны.

Первая глава «Обзор литературы» содержит два раздела. Один из них посвящен описанию явления клептопластии у моллюсков, роли водорослевых хлоропластов, а вторая представляет собой обзор состояния изученности формирования протопластов у морских ценоцитных водорослей. В обоих разделах главы наряду с историей изучения рассматриваемых в работе вопросов дается глубокий анализ глубины их изученности. В части, касающейся вопросов изучения процесса формирования у ценоцитных водорослей протопластов *in vitro*, автор цитирует работы, автором или

соавтором которых является она сама. Характер изложения материала в этой главе приводит к более глубокому пониманию причин выбора цели и задач исследования.

Вторая глава «Материалы и методы исследований» (стр. 25-32) показывает, что работа основана на большом фактическом материале, который собрался в природной среде, поддерживался и изучался в лабораторных культурах, обрабатывался и изучался разными методами в ходе проведения гидробиологических, микроскопических, биохимических, молекулярно-генетических исследований. Стоит отметить, что многие выполненные эксперименты и аналитические исследования весьма трудоемки и финансово затратны. Их диссертантка провела в лабораториях Хоккайдского университета и Национального университета Конджу, привлекаясь в качестве соисполнителя грантов этих университетов.

В главах 3-7 представлены результаты исследований и их обсуждение. Вся глава 3 посвящена описанию ценоцитных водорослей, использовавшихся для кормления моллюсков. Она дана в объеме, необходимом для понимания особенностей их морфологической и цитологической организации, размножения и регенерации после травматического воздействия и является необходимой для дальнейшего понимания результатов исследования и аргументированности выводов, дающихся в последующих главах.

Из третьей главы видно, что образование протопластов, является надежным способом расширенного вегетативного размножения ценоцитных водорослей, поскольку появляющиеся из них клетки по своему функциональному предназначению аналогичны зооспорам. При изучении развития протопластов *in vitro* автору удалось раздвинуть рамки привычного представления о том, что клетка не может существовать без клеточной мембраны. Ее исследования доказали, что протоплазма, вытекающая из клеточных сифонов ценоцитных водорослей не теряет жизнеспособности. У представителей этой группы генетически закреплена способность к опознаванию своих клеточных органелл их агглютинации, и последующему восстановлению клеточных оболочек и плазмомембраны.

Четвертая глава работы целиком посвящена характеристике основных объектов цитологических и молекулярных исследований – заднежаберным

моллюскам. Их изучение в природе и лабораторных культурах показало большую неустойчивость таксономических признаков, используемых в систематике этой группы. Поэтому для верификации видовой идентификации изучаемых животных автор секвенировала гены 16S и 28S рРНК и *Cox1*. Наши новые сиквенсы были зарегистрированы в базе данных NCBI, где им были присвоены порядковые номера.

В этой же главе были рассмотрены особенности содержания и воспроизводства изученных заднежаберных моллюсков в лабораторных условиях. Самым тонким звеном в протекании жизненного цикла моллюсков от яйца до яйца оказалась стадия планктотрофных велигеров. Для их питания предлагались разные культивируемые автором микроводоросли. Жаль, что на заключительных стадиях развития личинки моллюсков прекращали их потребление, и что автору так и не удалось подобрать им подходящий корм. В случае успешного решения этой проблемы у него бы появилась возможность наладить искусственное выращивание этих видов в целях медицинского использования. Вместе с тем наблюдения за развитием личинок указанных моллюсков показали, что водорослевые хлоропласты в желудках эмбрионов отсутствуют, следовательно, материнские особи не передают их последующему поколению. Эти наблюдения важны для аргументации выводов, сделанных автором в последней 7 главе работы.

Подробно рассмотрев экологию, жизненные циклы, биологию развития, питание и способы размножения у фигурантов, формирующих симбиотические связи, автор в главе 5 приступила к обсуждению процессов формирования протопластов. В литературном обзоре она показала, что само это явление, последовательность превращения протоплазмы в полноценные клетки в научной литературе были описаны. Однако до исследований автора было неясно, какие лектины участвуют в агглютинации водорослевой протоплазмы и какова экспрессия генов в ходе ее превращения в полноценные клетки. Было также неясно способна ли протоплазма водорослей включать в свой состав чужеродные органеллы и другие инородные тела. Эти сведения, как это видно из последующих глав, важны для понимания особенностей внутриклеточного сожительства чужеродных органелл в пищеварительных клетках моллюсков.

Результаты этой главы в наибольшей степени включают новые для науки данные, прежде всего, имею в виду нахождение нового класса лектинов. Они показывают уникальную способность протоплазмы ценоцитных водорослей к агглютинации и формированию протопластов *in vitro*, ее способность противостоять спонтанной гибридизации. Данные этой главы отчасти позволяют понять причины сохранения жизнеспособности водорослевой протоплазмы даже в пищеварительных клетках моллюсков.

Глава 6 содержит результаты и обсуждение данных цитологических исследований, направленных на изучение процессов накопления и использования моллюсками клептопластид. Основные выводы этой главы сделаны на основе анализа данных трансмиссионной микроскопии. Отмечу высокое качество представленных в работе микрофотографий. Интерпретируя представленные на них данные, автор демонстрирует глубокие знания клеточной морфологии и клеточной биологии и убедительно показывает, что пищеварительные клетки моллюсков «захватывают» не отдельные хлоропласты, как считалось раньше, 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. В этой главе автор вводит новое научное понятие «клептокариоз», т.е. воровство и присвоение чужих клеточных ядер. Из материалов этой главы видно, что протоплазма водорослей способна формировать протопласты не только во внешней среде, но даже внутри чужих клеток. Логичным является вывод автора о том, что ядра моллюсков попасть в них не могут из-за способности протопластов удалять чужеродные элементы, и что фотосинтез клептопластид регулируется собственными ядрами, в изобилии содержащимися в поедаемой моллюсками протоплазме.

В последней 7 главе приводится обсуждение результатов изучения механизмов формирования симбиотических связей между водорослями и моллюсками. Для этого автор выбрала моллюски с разной продолжительностью жизни, питающиеся бриopsisом, и рассмотрела фотосинтетическую активность клептопластид. Своими данными диссертантка убедительно показала, что их роль, как источника

дополнительного питания у голодающих моллюсков была сильно преувеличена. Об этом же, как показывает автор работы, говорят и данные транскриптомного анализа изученных видов моллюсков. В последнем 5 разделе 7 главы дает свое видение процессов использования моллюсками водорослевой протоплазмы и на этом, ответив на все поставленные в работе вопросы и обосновав все выдвинутые к защите положения, диссертант завершает обсуждение механизмов симбиотических отношений между зелеными ценоцитными водорослями и заднежаберными фотосинтетическими моллюсками на субклеточном уровне.

В заключении обобщены результаты исследований, которые, безусловно, обогащают морскую экологию новыми открытиями и способствуют дальнейшему развитию философии биологии, призванной, прежде всего, определить объем понятия «жизнь» и обозначить границы, в пределах которой она сохраняется, проявляется и развивается.

Выводы работы изложены четко. Они дают ответ на все поставленные в работе задачи и не вызывают сомнений. Содержание диссертации соответствует указанной специальности.

В качестве замечаний и пожеланий к дальнейшим исследованиям отмечу следующее.

1. Разделы «Научная новизна» и «Теоретическая и практическая значимость» написаны слегка хаотично. В научной новизне стоило бы поменять местами первый и второй абзац, поскольку сейчас частный вывод стоит выше более общего. Кроме этого, некоторые формулировки результатов, описанных в «Теоретической и практической значимости», логичнее было бы отнести в раздел «Научная новизна». Например, сообщение об открытии новых видов лектинов.

2. Автору, как мне видится, стоит быть посмелее в описании результатов и идти немного дальше в выводах. Так, стоит не просто констатировать открытие нового класса лектинов, а давать ему авторское название и закреплять в мировой научной литературе.

3. Положение 3 выглядит не полным и поспешным. Результат дается без описания и не понятно о чем он свидетельствует и что автор защищает им.

4. Из раздела «Материалы и методы» не совсем ясно, почему из 7 видов собранных моллюсков были отобраны именно эти 3. Хочется прояснить принцип отбора и спросить, к каким трофическим типам относятся остальные неиспользованные в работе виды моллюсков.

5. Крайне интересная мысль о том, что водоросли используют моллюски для своего размножения, позволяет сделать вывод, о том, что мы можем иметь дело с разновидностью симбиоза – комменсализмом, и, в частности, с зоохорией. Автору стоило бы поподробнее рассмотреть этот вопрос, а не ограничиваться лишь понятием «симбиоз».

6. Степень гомологии до 40, и даже до 60-70% обычно рассматриваться лишь как тенденция к родству. Если мы внимательно рассмотрим ряды гомологии основных групп белков, то обнаружим, что между нами, бактериями, водорослями, грибами и растениями больше половины семейств белков будут находиться в диапазоне от 40 до 60% гомологии. В биоинформатике принято обсуждать близкое родство лишь при степени гомологии более 80%.

7. Считаю, что автор открыл куда более важные процессы, чем, безусловно, по скромности своей, указал в работе. Существование безмембранных структур длительное время и постепенное создание на их поверхности из «заплаток» плазмалеммы является важным шагом к пониманию процесса возникновения жизни на Земле. Уверен, что в дальнейших работах, Татьяна Андреевна углубит частные открытия на пути к новым фундаментальным обобщениям.

8. Автором почти не обсуждается процесс полиплоидии, хотя и указано существование трехядерных клеток. Хотелось бы понять, что происходит внутри этих ядер? Являются ли эти клетки ди-, тетра- или полиплоидными?

9. Процесс вакуолизации, описанный автором, может являться как нормальным (секреторные клетки), так и патологическим. В частности, в цитопатологии вакуолизация рассматривается как ответная реакция на повреждение.

В целом, эти замечания, не носят принципиального характера и могут быть легко устранены.

Работа оформлена в соответствии с нормативными требованиями. Несмотря на изобилие специальных терминов и понятий без которых не обходится ни одна научная работа, читается легко, с большим интересом. Автореферат написан четким понятным языком, соответствует рукописи диссертационной работы. Он в достаточной мере проиллюстрирован. Основные работы по материалам диссертации опубликованы в международных рецензируемых научных журналах, зарегистрированных в базах данных Scopus и Thomson Reuters (12) и в российских рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ (2), многократно докладывались на научных конференциях и симпозиумах в России и за рубежом.

Диссертационная работа Клочковой Татьяны Андреевны соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, соискатель заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 - Экология (биологические науки).

Официальный оппонент

Голохваст Кирилл Сергеевич,

доктор биологических наук
(специальность 03.02.08 – Экология),
проректор по научной работе,
профессор кафедры безопасности
жизнедеятельности в техносфере



ФГАОУ ВО

«Дальневосточный федеральный университет»

690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8,

тел. 8 800 555 0 888, факс 8 (423) 243-23-15,

e-mail: rectorat@dvfu.ru,

сайт: <https://www.dvfu.ru>