

Отзыв официального оппонента,

доктора химических наук, профессора **Усова Анатолия Ивановича** на диссертацию **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 (биология)**.

Явления симбиоза распространены в живой природе чрезвычайно широко. Не будет преувеличением сказать, что вся биосфера служит примером симбиоза бесчисленного количества видов живых организмов. Некоторые частные случаи симбиоза, такие как биология лишайников или наличие клубеньковых бактерий на корнях бобовых, изучены достаточно широко. Однако в Природе, несомненно, имеется множество других примеров симбиотических отношений различных организмов, особенно удивительных для морской биоты. Один из подобных примеров, взаимодействие морских ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков, послужило предметом рассматриваемой диссертационной работы. Такого рода исследования имеют важное фундаментальное значение и актуальны потому, что способствуют формированию правильного мировоззрения в области происхождения жизни и путей эволюции живых систем на планете Земля.

Талломы ценоцитных зеленых водорослей построены из крупных многоядерных клеток или даже представляют собой одну гигантскую клетку. Моллюски питаются протоплазмой этих клеток и способны включать находящиеся в ней хлоропласты в свои пищеварительные клетки и сохранять их там в жизнеспособном состоянии (это явление получило название клептопластии). Ранее считалось, что ядра клеток моллюсков аккумулируют водорослевые гены, кодирующие процессы фотосинтеза, и это помогает моллюскам существовать за счет продуктов фотосинтеза, поставляемых

клеттопластидами. Задачей диссертационной работы было выяснение, так ли это на самом деле, существует ли в действительности перенос генов, в чем состоит реальная функция клеттопластид, как протоплазма водорослей сохраняет жизнеспособность в условиях эндосимбиоза, как из нее формируются новые протопласты и какова судьба водорослей, повреждаемых моллюсками.

Для ответа на эти вопросы необходимо было выполнить огромный объем разнообразных исследований. Нужно было собрать в природных популяциях несколько видов водорослей и моллюсков и освоить их аквариумное культивирование в лаборатории, что позволило проводить длительные наблюдения за влиянием различных экологических факторов на развитие этих организмов. Для выделения лектинов из водорослей были использованы приемы аффинной хроматографии, а для характеристики лектинов – современные методы аналитической химии белков. Для транскриптомного анализа генетического материала моллюсков и водорослей использовались новейшие методы секвенирования. Все это свидетельствует о чрезвычайно широкой и разносторонней квалификации автора работы.

Большая диссертация состоит из нескольких глав. Первая из них посвящена обзору литературных данных и в свою очередь содержит два раздела. Один из них посвящен описанию явления клеттопластии у моллюсков, роли водорослевых хлоропластов как пищевого ресурса, обоснованию и последующему опровержению гипотезы горизонтального переноса генов фотосинтеза. Раздел содержит также сведения о весьма интересной жесткой пищевой привязанности моллюсков к определенным видам водорослей. Во втором разделе изложены биологические особенности ценоцитных зеленых водорослей и данные об образовании протопластов из сгустков протоплазмы, вытекающей из поврежденных талломов этих водорослей.

В главе 2 подробно описаны материалы и методы исследований, использованные в работе. Автор научилась получать и культивировать водорослевые протопласты в искусственной среде с микроскопическим контролем. Для выделения лектинов была использована аффинная хроматография на колонке с N-ацетилглюкозамин-агарозой, а выделенные лектины были охарактеризованы данными определения фитогемагглютинирующей активности, результатами дегликозилирования, определения аминокислотного состава и молекулярной массы. Протопласты использовали для изучения их способности к гибридизации и включению посторонних частиц, в том числе одноклеточных микроводорослей. Для характеристики природных популяций моллюсков были проведены продолжительные полевые наблюдения, а также осуществлено культивирование моллюсков в аквариумах. Специальные условия культивирования были разработаны для наблюдения за функционированием водорослевых хлоропластов в клетках моллюсков и для определения их фотосинтетической активности. Белки протопластов и водорослевых клеток изучали методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Были проведены также обширные генетические исследования как водорослей, так и моллюсков.

Полученные результаты изложены и обсуждаются в главах 3-7. В главе 3 описана биология видов макроводорослей, принадлежащих родам *Bryopsis* и *Chaetomorpha*, которые использовались для кормления моллюсков. Особый интерес представляет обнаруженная автором способность протоплазмы этих водорослей к образованию протопластов после травматических повреждений талломов. В обширной главе 4 подробно изложены данные о биологии развития и рационах питания трех видов моллюсков, использованных в работе. Эти сведения являются новыми для науки и чрезвычайно важны для разработки условий массового культивирования моллюсков – живых объектов, весьма перспективных в качестве моделей для экспериментальных исследований и возможного медицинского использования. В главе 5 описаны

молекулярные характеристики двух новых лектинов, которые удалось выделить из водоросли *Bryopsis plumosa*, протеомный анализ протопластов этой водоросли и образовавшихся из них клеток, а также механизмы защиты протоплазмы разных видов ценоцитных зеленых водорослей от спонтанной гибридизации. В главе 6 описано клеточное строение тканей моллюсков, использованных в работе, и изменения в тканях, вызываемые голоданием. Показано, что пищеварительные клетки моллюсков захватывают не хлоропласты водорослей, а сгустки протоплазмы, содержащие все клеточные органеллы, включая ядра, что позволяет этим включениям автономно существовать в теле моллюсков. В условиях длительного голодания эти включения используются в качестве пищевого резерва. Наконец, глава 7 посвящена итоговым заключениям о механизмах формирования симбиотических связей между ценоцитными зелеными водорослями и заднежаберными моллюсками по результатам проведенного комплексного исследования.

Диссертация заканчивается выводами, в которых автор с исчерпывающей полнотой формулирует все важнейшие достижения проведенной работы, и списком цитированной литературы, который насчитывает 245 публикаций.

Следует подчеркнуть, что материалы диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых международных журналах, неоднократно докладывались на престижных и представительных международных форумах и получили высокую оценку научной общественности. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Необходимо отметить превосходные литературные качества диссертации. Работа написана прекрасным литературным языком и читается с неослабевающим интересом. Текст практически свободен от опечаток и неудачных выражений.

К работе можно сделать лишь несколько критических замечаний.

1. Автор утверждает, что превращение сгустков водорослевой протоплазмы в протопласты начинается с образования первичной полисахаридной оболочки, но в работе нет химических доказательств полисахаридной природы этой оболочки.
2. Выделенные автором новые лектины, по всей вероятности, являются гликопротеинами, но в работе нет определения углеводного состава этих важных соединений.
3. В работе получены данные о высокой избирательности моллюсков по отношению к водорослям, которыми они питаются, но не высказано предположений о химической природе веществ, которые обеспечивают эту избирательность.
4. В работе используется неточный термин «дегликолизация» вместо дегликозилирования.

Сделанные замечания несколько не влияют на общую высокую оценку работы. Автором выполнено исследование уникальной симбиотической системы, в которой моллюски, благодаря способности включать протоплазму водорослей в свои пищеварительные клетки, решают пищевые проблемы, а повреждая водоросли, не вредят их природным популяциям, а напротив, способствуют их расселению. Диссертация является фундаментальным вкладом в альгологию и клеточную биологию, одновременно главным практически важным ее результатом представляется выделение и характеристика двух новых лектинов, которые могут найти применение как биологически активные вещества в качестве медицинских препаратов. Для выполнения этой работы автору пришлось пользоваться методами экспериментальной альгологии и зоологии, цитологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики. Таким разносторонним специалистом и должен быть современный исследователь, работающий в области экологии.

Диссертационная работа **Клочковой Татьяны Андреевны** по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне безусловно удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к

докторским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842), а ее автор – **Клочкова Татьяна Андреевна** заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности **03.02.08 – Экология (биология)**.

Усов Анатолий Иванович

Доктор химических наук, профессор

Почтовый адрес: Москва 119991, Ленинский проспект, 47, ИОХ РАН

Телефон: (499)137-67-91

Адрес электронной почты: usov@ioc.ac.ru

Наименование организации (полное/сокращенное): ФГБУН Институт органической химии имени Н.Д.Зелинского РАН (ИОХ РАН)

Подпись Усова Анатолия Ивановича заверяю

Ученый секретарь, к.х.н. Коршевец Ирина Константиновна

18 апреля 2017 г.

