

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 (биология)

Диссертационная работа **Клочковой Татьяны Андреевны** - это серьезное обобщение многолетних исследований ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков на видовом, клеточном и молекулярном уровнях и их взаимоотношений, прежде всего, на уровне взаимодействия органелл растительных и животных клеток. Работа представляется как крупное научное достижение, расширяющее наши знания о взаимосвязи растительного и животного мира.

Представленная работа - современная, выполнена на новейшем оборудовании, с использованием самых последних достижений в области молекулярной биологии, направлена на решение вопросов о развитии жизни во взаимодействии фототрофных и гетеротрофных организмов. В работе решаются как научные проблемы общей биологии, так и частные вопросы морской экологии – механизмы и стратегии симбиотических взаимоотношений водорослей и беспозвоночных. Необычная работа, выполнена на необычных объектах, имеющая, прежде всего, научное значение. Хорошие научные знания всегда находят и практическое применение. Выяснение механизмов регенерации зеленых водорослей на клеточном и молекулярном уровнях со временем найдет и соответствующее практическое использование, в частности, использование в медицине химических соединений, обеспечивающих ранозаживление и восстановление поврежденных плазматических мембран.

Рецензируемая диссертационная работа представляет собой рукопись объемом 244 страницы, включая список литературы. Список литературы содержит 245 источников, из них 209 – работы зарубежных авторов, имеется 15 ссылок на интернет-источники. Текст диссертации занимает 200 страниц и состоит из введения, семи глав, заключения, выводов. Иллюстративный материал включает 56 рисунков и 9 таблиц.

Во введении (стр. 5-13) представлена общая характеристика диссертации. Здесь дается описание актуальности, научной новизны и практической значимости диссертации, формулируются цели и задачи работы, методология исследования, выносимые на защиту положения, приводятся и другие формальные сведения, требуемые от диссертанта.

В первой главе «Обзор литературы» (стр. 14-40) рассматривается история изучения «фотосинтетических» заднежаберных моллюсков, их клетки содержат как животные, так и растительные органеллы; вторая часть посвящена организации не менее уникальных организмов – сифоновых и сифонокладиевых водорослей, которыми питаются эти моллюски. Из представленных в этой главе материалов возникает много интригующих

вопросов, на некоторые из которых и попытался ответить аргументировано, с научными доказательствами автор данной диссертационной работы.

В первом разделе главы показано, как изменялись представления о взаимоотношении моллюсков и водорослей, о роли хлоропластов внутри клеток животных, о регуляции процесса фотосинтеза в хлоропластах, находящихся в чужеродных клетках - вопросов много, четкие ответы в науке отсутствуют, и, как бывает в таких случаях, доминируют домыслы. Один из весьма новых и интересных вопросов – включает ли наследственная информация ДНК моллюсков гены, способные регулировать фотосинтез (явление горизонтального переноса генов).

Второй раздел посвящен состоянию изученности организации ценоцитных водорослей, являющихся пищей «фотосинтетических» моллюсков. Эти водоросли представляют собой или одну гигантскую клетку с множеством ядер, или слоевище состоит из клеток-сифонов со многими ядрами. Такие клетки могут быть легко травмированы в динамичных условиях морских побережий. Как выжила данная группа, имеющая очень древнее происхождение и широко распространенная в настоящее время? Из работы следует, что у них существует уникальный механизм регенерации – формирование новых клеток из вытекшей в морскую воду протоплазмы, т.е. у данной группы примитивных растений имеется колоссальный потенциал к самосохранению.

Показано, что научных сведений недостаточно для ответа на возникающие вопросы, нет полноты понимания процесса ассимиляции хлоропластов в клетки моллюсков. Автор работы справедливо утверждает, что поставленные вопросы относятся к числу вопросов о сущности жизни и ее развитии, что «научное решение этой сложнейшей задачи лежит на стыке биологических и философских знаний».

Итак, в первой главе диссертации рассматривается история изучения необычных объектов исследования и постановки вопросов, при решении которых Ключкова Т.А. непосредственно принимала участие. Глава написана ярко, эмоционально, ёмко, рассматриваются разные гипотезы, в том числе и прямо противоположные, ставятся вопросы, в том числе на стыке биологии и философии. Представлены современные литературные данные по новому научному направлению, которое стремительно развивается, когда ежегодно поступает совершенно новая информация, иногда опровергающая старые общепринятые представления.

Из второй главы «Материалы и методы исследований» (стр. 41-61) видно, что работа основана на большом фактическом материале, с использованием в комплексе различных методик, соответствующих разным уровням исследования объектов, и современного оборудования.

При изучении водорослей использовался материал из природных сообществ и коллекций культур. Он включает достаточно большой список видов лабораторных культур (морские и пресноводные, бентосные и планктонные - красные, диатомовые, зеленые). Подробно описана методика содержания в культуре ценоцитных водорослей, которыми питаются заднежаберные моллюски. Разработана и описана методика получения протопластов зеленых водорослей и их культивирования. В ходе работы был проведен протеомный анализ протопластов и клеток *Bryopsis*. Подробно представлена методика выделения лектинов, участвующих в процессе формирования протопластов водорослей, используются сложные химические методы определения молекулярной массы лектинов и их аминокислотного состава. Молекулярные исследования включают применение разнообразных методик. При гибридизации протоплазмы разных видов водорослей разработана методика внедрения чужеродного материала в их протопласты.

Проведены наблюдения за поведением и питанием заднежаберных моллюсков в природных местах обитания и лабораторных условиях; разработана методика содержания и кормления этих «прихотливых» в пище беспозвоночных. Изучение функционирования хлоропластов в клетках моллюсков основано на измерении флуоресценции хлорофилла

«а». Применяется трансмиссионная электронная микроскопия при исследовании строения пищеварительных клеток и включенных растительных органелл. Молекулярные исследования моллюсков основываются на применении соответствующих методик.

Из возможных замечаний к данной главе: не помешала бы сводная таблица с представлением общего объема изученного материала и объема использованных методик.

Таким образом, в диссертационной работе применяются сложные современные методики, с использованием новейшего оборудования для решения непростых задач. Это комплексное исследование, охватывающее изучение автотрофных и гетеротрофных организмов и их взаимодействия на организменном, клеточном и молекулярном уровнях с соответствующими каждому уровню методиками исследований. Понятно, что такие обширные работы с комплексом методик делаются научными коллективами, где важен каждый участник. В представленной работе четко прописано, что сделано автором диссертации. В целом, методическая часть диссертационной работы изложена подробно, используется большой массив данных, автор владеет материалом в полной степени и адекватно использует методики научных исследований, все это позволяет доверять полученным результатам работы.

Главы 3-4 (с. 62-107) содержат описание объектов исследований – ценоцитных зеленых водорослей (глава 3) и заднежаберных моллюсков, ими питающихся (глава 4). Одним из ключевых моментов успеха экспериментальных исследований является правильный выбор объектов. Поэтому согласна с автором диссертации, которая посвятила им особые главы, в которых подробно, с аргументами, не побоюсь сказать, с большой любовью, дано обоснование, почему были выбраны те или иные объекты для сложных в постановке экспериментальных исследований.

Третья глава «Общая характеристика объектов цитологических и молекулярных исследований - водоросли» (стр. 62-76). Здесь приводятся подробные сведения о распространении видов, в том числе в дальневосточных морях, данные о морфологии и размножении основаны, прежде всего, на собственных многолетних наблюдениях, в том числе при изучении развития видов в культуре. Приводятся захватывающе интересные сведения о биологических особенностях видов. При исследовании в культуре жизненных циклов водорослей (*Bryopsis*, *Chaetomorpha*) доказано, что характерным является вегетативный способ размножения путем формирования протопластов, который служит одним из механизмов выживания этой эволюционно древней группы. Изучена и подробно описана последовательность формирования протопласта. Описаны уникальные способы воспроизводства, обеспечивающие гибкость процессов регенерации при повреждениях ценоцитных зеленых водорослей.

В главе 4 «Общая характеристика объектов цитологических и молекулярных исследований – заднежаберные моллюски» (стр. 77-107) автором представлены результаты изучения питания, развития, размножения трех видов заднежаберных моллюсков. Разработаны условия и методы содержания в лабораторной культуре выбранных для экспериментов объектов, методы управления скоростью прохождения этапов развития и интенсивностью продукционных процессов. Показано, что моллюски при питании отдают предпочтение определенным видам водорослей. Использование того или иного корма позволяет моллюскам регулировать время откладки яиц, замедлять или ускорять, т.е. сроки размножения зависят от питания и определяются массой тела. Представлены основные биологические характеристики трех видов, важных с точки зрения экспериментов по изучению симбиотических взаимоотношений. Проведена молекулярная идентификация изученных видов заднежаберных моллюсков. Продемонстрировано молекулярно-филогенетическое древо изученных образцов.

В этой главе хотелось бы увидеть общие сведения о строении пищеварительной системы заднежаберных моллюсков, чтобы было понятно, как и куда попадают растительные компоненты («клептопластыды»).

В главах 3-4 представлены хорошие натурные фотографии, показывающие особенности жизненных циклов изученных водорослей и моллюсков. Все научные положения детально аргументируются, как «за», так и «против».

В следующих главах (5-7) рассматриваются вопросы: формирование протопластов из протоплазмы зеленых водорослей в морской воде (глава 5), функционирование протопластов водорослей в теле моллюсков (глава 6) и в заключительной главе - симбиотические связи между водорослями и моллюсками (глава 7). Диссертационная работа в целом логично построена.

Глава 5 (с. 108-143) отражает результаты и обсуждение материалов. Изучены: лектины, обеспечивающие агглютинацию протоплазмы при повреждении клеточной стенки и выходе содержимого в морскую среду (раздел 5.1.); формирование протопластов с первичной полисахаридной оболочкой, затем с плазматической мембраной (раздел 5.2); механизм защиты протоплазмы от включения чужеродного материала (раздел 5.3).

Раздел 5.1 посвящен молекулярной характеристике лектинов. Оказывается, что при естественных механических повреждениях или, например, при поедании зеленых водорослей моллюсками существует механизм, при помощи которого компоненты клетки не расплываются, а собираются в сгустки, которые покрываются сначала первичной оболочкой, а затем мембраной. Агглютинация сгустков осуществляется с помощью лектинов. Выделены и изучены два типа лектинов: бриохилин и VPL-3, при их наличии протоплазма способна к агглютинации и формированию протопластов. Два лектина находились в сцепленном состоянии, был найден способ их разделения. Определена молекулярная масса лектинов. Представлена полная нуклеотидная и аминокислотная последовательность бриохилина. Проведено сравнение бриохилина с лектинами растений, показано, что основная роль лектинов ценоцитных зеленых водорослей – агглютинация протоплазмы при повреждениях целостности клетки. Сделано заключение, что лектины ценоцитных зеленых водорослей - это новые для науки фитогемагглютинины.

В разделе 5.2 представлены исследования по экспрессии генов на разных стадиях формирования протопластов. Доказано, что при трансформации протоплазмы в протопласты с первичной полисахаридной оболочкой, затем в клетки с липидной мембраной – в зависимости от стадии развития экспрессия генов была разной. Представлены микрофотографии (с помощью трансмиссионного электронного микроскопа) строения протопласта водорослей в разные периоды формирования. Изучены протеомные карты, показывающие белки с разным уровнем экспрессии на разных стадиях развития протопластов и клеток, изучены молекулярные характеристики белков (табл. 5), проведена их идентификация (табл. 6). Доказано, что безмембранные протопласты (= сгустки протоплазмы) проявляют себя как обычные клетки и осуществляют последовательный синтез белков для построения оболочки клетки водорослей.

В разделе 5.3 представлены исследования по гибридизации протоплазмы разных видов и внедрение инородного материала в протопласты. При изучении способности протопластов включать в себя разные виды одноклеточных микроводорослей доказано, что они никогда не включаются в протоплазматические сгустки. Показано, что это можно сделать принудительно (разработана методика), но такие протопласты погибают. Кроме того, проведены эксперименты по гибридизации протоплазмы разных видов, которые показали, что гибридные протоплазмы *Bryopsis* и *Chaetomorpha* не образуются. Не смешиваются и протопласты разных видов *Bryopsis* (они формировались, но в растения не развивались). Сделано заключение: способность к агглютинации и формированию протопластов, защита от спонтанной гибридизации – доказательство способности этих водорослей выживать в экстремальных условиях. Это лежит в основе того, что протоплазма остается в функциональном состоянии в пищеварительных клетках моллюсков. Видеосъемка демонстрирует хорошо выраженную способность избавляться от чужеродного материала. Красив эксперимент (рис. 36), демонстрирующий оптические

срезы протопластов с включенными флуоресцентными микросферами, показано как они выталкиваются. Хорошо подобраны микрофотографии, показывающие результаты выполненных экспериментов.

Глубокий анализ полученных результатов и скрупулезное доказательство новых научных положений в значительной степени способствуют достижению поставленных автором задач. В целом данная глава хорошо документирована и не вызывает замечаний относительно представленных данных и их обсуждения. Совокупность теоретических положений, сформулированных в данной главе, позволяет рассматривать эту работу как крупное научное достижение в области морской экологии.

В главе 6 (с. 144-164) обсуждаются вопросы, где находятся клептопласты, в каком виде, как они используются. Для решения этих вопросов проведены цитологические исследования строения параподий двух видов заднежаберных моллюсков на основе микрофотографий ультратонких срезов. Приводится детальное описание цитологического строения откормленных особей элизий и особей, перенесших голодание.

Эксперименты показали участие клептопластид в трофообеспечении «фотомоллюсков», полученные от разных видов клептопласты имеют разную энергоценность, моллюски питаются избирательно. Как результат: моллюски, питающиеся хлоропластами одних видов - их особи меньше, но живут дольше; другими – особи крупные, но продолжительность жизни короче. Показано, что пищеварительные клетки захватывают не отдельные хлоропласты, а сгустки протоплазмы, содержащие все клеточные компоненты. «Живые водорослевые консервы» – такая стратегия питания, безусловно, предпочтительнее. Сделано заключение: способность моллюсков к длительному голоданию основана на том, что они содержат протопласты водорослей. В работе доказано, что протопласты способны к автономному существованию (морской среде или пищеварительной системе моллюска).

Таким образом, получены новые данные о строении заднежаберных моллюсков. Диссертационная работа ставит и дальнейшие задачи для исследований: не установлен путь проникновения хлоропластов в клетки параподий моллюска. В работе представлены хорошего качества микрофотографии, полученные с помощью с трансмиссионного электронного микроскопа.

В связи с представленными в этой главе данными, хотелось в главе 4, где дана детальная характеристика объектов, увидеть и общие сведения о строении пищеварительной системы этих моллюсков.

В главе 7 (с.165-192) обсуждается роль фототрофных компонентов в клетках гетеротрофных организмов на примере взаимоотношений между зелеными водорослями и заднежаберными моллюсками. Для экспериментального изучения использованы три вида моллюсков - *Placida baba* (раздел 7.1), *Elysia atroviridis* (раздел 7.2), *E. nigrocapitata* (раздел 7.3.). Исследования показали, что стратегии жизненных циклов этих трех видов моллюсков различаются, в связи с этим и их взаимоотношения с «клептопластидами» также различаются. Виды осуществляют кратковременный или долговременный захват клептопластид, их фотосинтетическая активность сохраняется, у одного из видов - в меньшей степени, у двух других – в большей степени. Доказывается, что моллюски накапливают неповрежденные хлоропласты для длительного резервирования в качестве запасных веществ и расходуют при голодании.

В разделе 7.4 представлены исследования наличия в геноме моллюсков генов, кодирующих фотосинтез, поскольку было показано, что ассимилированные хлоропласты в клетках моллюсков продолжают функционировать, т.е. сделана попытка ответить на вопрос о горизонтальном переносе генов, регулирующих фотосинтез, от водорослей к моллюскам. Используется тщательная методика, обеспечивающая «чистоту» эксперимента. В работе показано, что гены не обнаружены в моллюсках *Placida baba* и

Elysia nigrocapitata, у третьего вида (*E. atroviridis*) несколько потенциальных генов было найдено. Сделано заключение, что не исключается возможность наличия этих генов в ядерном геноме *Elysia atroviridis*, для этого требуются дальнейшие исследования.

В разделе 7.5 приводятся рассуждения, за счет чего выживают фотосинтетические моллюски, обсуждается, что является научным фактом, что – домыслом. Выполненные исследования ликвидируют некоторые мифы. Доказано, что на свету клептопластиды нестабильны и уменьшают свою фотоактивность в течение нескольких дней; при тусклом свете и в темноте клептопластиды остаются неповрежденными длительное время; при голодании моллюски теряют вес, т.е. глюкоза «клептопластид» не может обеспечить им полноценное существование, т.е. роль клептопластид преувеличена. Клептопластиды от разных видов обладают неодинаковой эффективностью: если моллюск кормится хетоморфой, то успешно размножается, но живет недолго; при смене корма живет дольше, но стерилен. Консервация и использование «живой» пищи – интересный вопрос.

Замечания. Известно, что интенсивность фотосинтеза в условиях постоянного света снижается в длительных экспериментах. Поэтому возникает вопрос, почему в экспериментах не использовались условия смены дня и ночи, т.е. условия, приближенные к естественной среде обитания. В главе можно было сделать два раздела, один – эксперименты по фотосинтетической активности, второй – рассуждения о роли хлоропластов в теле моллюсков. Это заключительная глава, в которой хотелось бы видеть прежде всего обсуждение. Часть представленных в этой главе данных можно было бы включить в главу 4. На рисунках с данными о влиянии уровня света на фотосинтез клептопластид (рис. 53 и др. в рукописи и рис. 7 в автореферате) представлены не все обозначения, отражающие статическую обработку данных.

В заключении (стр. 193-197) подводятся итоги диссертационной работы; подчеркивается сущность и значение тех научных открытий, что были сделаны в настоящем исследовании.

Выводы (с. 198-200). Все 8 сделанных автором аргументированы, раскрыты в рукописи диссертационной работы и автореферате и не вызывают сомнений.

Автореферат написан четким понятным языком, хорошо оформлен и иллюстрирован. Содержание автореферата соответствует диссертации

Таким образом, диссертационная работа является законченным научным исследованием. Это крупное научное обобщение, содержит новые научные данные. Работа отличается оригинальностью и новизной. Характерен глубокий аргументированный анализ представленных данных. Работа ставит новые и весьма интересные задачи для проведения дальнейших исследований. Содержание диссертации соответствует указанной специальности.

Работа хорошо иллюстрирована и оформлена, написана ярким языком, поэтому хорошо читается. Работу отличает четкая структура, поэтому она выглядит цельной. Автора диссертации отличают основательные знания структурных и функциональных особенностей двух взаимодействующих групп организмов – фототрофов (зеленые водоросли) и гетеротрофов (заднежаберные моллюски) на видовом, клеточном и молекулярном уровнях организации. Представленную Ключковой Т.А. диссертацию отличает тщательность и продуманность исполнения, детальность в обработке и изложении материала.

Основные защищаемые автором положения в достаточной мере обоснованы фактическим материалом, раскрыты в автореферате и публикациях. По материалам диссертационного исследования опубликовано: 1 коллективная монография и 15 статей, из которых 12 – в ведущих международных научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Thompson Reuters, 2 – в российских научных журналах их списка ВАК. Результаты работы прошли апробацию как на федеральных, так и на международных симпозиумах и конференциях.

Диссертационная работа *Клочковой Татьяны Андреевны* «Механизмы формирования симбиотических связей и стратегия совместного выживания некоторых видов морских ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков» - это крупное научное достижение, отражает новое научное направление, оригинальное исследование, имеющее теоретическое и практическое значение, соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Соискатель заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08-Экология (биология).

Зав. кафедрой биологии
Мурманского государственного технического университета
доктор биологических наук, профессор

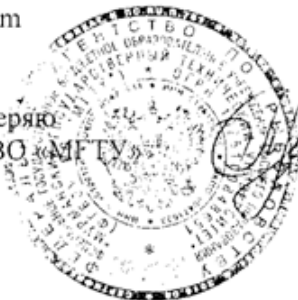
Е.В.Шошина

14.04.2017 г.

183010 Россия, г.Мурманск,
Ул.Спортивная, 13, МГТУ

Раб. тел 8 (8152) 40 33 53
Моб +7 921 175 82 31
E-mail: shoshinaev@gmail.com

Подпись Шошиной Е.В. заверяю
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «МГТУ»



Пронина Т.В.