

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского морского биологического института Кольского научного центра Российской академии наук

д.б.н., профессор



П.Р. Макаревич  
28 апреля 2017 г.

Отзыв ведущей организации Мурманского морского биологического института КНЦ РАН 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).

Диссертация Татьяны Андреевны КЛОЧКОВОЙ посвящена проблеме, привлекающей внимание биологов много лет: симбиозу в живой природе. Данное природное явление рассматривается исследователями на разных уровнях организации: от образования разнородных внутриклеточных контактов (митохондрии/хлоропласты, митохондрии/ядро, хлоропласты/эндоплазматический ретикулум) до создания симбиотических ассоциаций, в которых участвуют до нескольких организмов различной систематической принадлежности (гидроидный коралл *Millepora*), и определения значения симбиоза для развития ассоциации в целом и каждого члена ассоциации в отдельности.

Диссертантом рассмотрены механизмы формирования симбиотических связей и стратегия совместного выживания некоторых видов морских ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков. Важность для теоретической биологии этого направления исследования несомненна: выяснение механизмов внедрения органелл растительных клеток в клетки животных и их сосуществования, формирования симбиотических взаимоотношений вносит вклад в развитие теории симбиогенеза, представления о взаимосвязи и взаимозависимости видов, как единства живой материи. Актуальность выполненной работы не вызывает сомнений и с практической точки зрения: выделение из водорослей химических веществ, способствующих восстановлению плазматических мембран и клеточных стенок ценоцитных водорослей, открывает новые подходы к работе с культурами клеток, их использованию в медицинской биотехнологии.

Диссертационное исследование выполнено на 224 страницах, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа проиллюстрирована 56 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 245 публикаций, из них 209 иностранных и 15 ссылок на интернет-источники.

В разделе Введение диссертантом достаточно обоснованно и лапидарно представлены основные положения диссертации от актуальности темы, цели исследования и многообразия задач, решение которых необходимо для ее достижения до личного вклада автора в работу. Приятно поражает сконцентрировано раскрытая в разделе научная новизна результатов исследования. Это относится к выполненной молекулярной характеристике новых лектинов водорослей – бриохилина и BPL-3, участвующих в процессе «сборки» протопластов у *Briopsis plumosa* и впервые проведенному протеомному анализу протопластов *B. plumosa*, и, конечно, к сделанному выводу, что клептопластиды – это, прежде всего, поддерживаемые в живом состоянии резервные пищевые ресурсы, а не поставщики основного питания. Перечисленные и другие результаты исследования дают полное представление о научной новизне и не позволяют сомневаться в **теоретической значимости** рецензируемой диссертации.

**В главе I** «Обзор литературы» приведен критический обзор литературных сведений о «фотосинтетических моллюсках», феномене, описанном впервые около 50 лет назад, а также явлении «клеттопластии» и гипотезы горизонтального переноса генов, регулирующих фотосинтез клептопластид, от водорослей к моллюскам и ее опровержение. В разделе проанализированы особенности цитологической и морфологической организации ценоцитных зеленых водорослей, составляющих пищу «фотосинтетических моллюсков», процесс формирования протопластов *in vitro* из вытекшей протоплазмы. Глубокое знание литературы о предмете исследования и собственный исследовательский опыт позволили диссертанту определить новый подход к изучению механизмов сохранения протоплазмы определенных видов водорослей внутри клеток моллюска и ее способности вступать с ними в эндосимбиотические взаимоотношения

**В главе 2** «Материалы и методы исследования» представлены использованные в работе методы: от сбора и культивирование моллюсков, а также микро- и макроводорослей, биохимических методов выделения бриохилина и BRL-3 до методов молекулярной биологии, электронной микроскопии. Применение столь широкого спектра современных методов исследования, модернизация и разработка ряда из них вызывает уважение к исследователю, повышает достоверность полученных результатов.

В главах 3-7 представлены «Результаты исследования и их обсуждение», направленные на понимание (раскрытие) механизмов формирования симбиотических связей между моллюсками и водорослями и их функциональную значимость.

Для решения поставленных задач Татьяне Андреевне Ключковой пришлось досконально исследовать биологические особенности основных видов макроводорослей, использованных в наблюдениях для кормления моллюсков, представителей родов *Bryopsis* и *Chaetomorpha*.

Диссертантом в результате проведенных экспериментов было показано, что клеточная протоплазма, вытекающая из травмированной клетки с полностью разрушенной плазматической мембраной, в морской воде не погибает. В первые же часы своей жизни она формирует протопласты, окруженные полисахаридной или полисахаридно-белковой оболочкой, которая, тем не менее, обладает функциями плазмалеммы. Это позволяет протопластам, как обычным клеткам, осуществлять необходимые биохимические реакции, в том числе синтез белков. Исследователь приходит к важному выводу, что у ценоцитных зеленых водорослей вытекание протоплазмы за пределы плазмалеммы не имеет катастрофических последствий, а является лишь заложенным на генетическом уровне способом вегетативного размножения.

По мнению диссертанта полной дезинтеграции вытекшей *in vitro* протоплазмы препятствует процесс агглютинации клеточных компонентов, который осуществляется посредством формирования между ними комплементарных лектин-углеводных связей. Автором впервые описаны молекулярные характеристики двух новых лектинов: бриохилин и BPL-3, вовлеченных в процесс агглютинации клеточных компонентов у *Bryopsis plumosa*.

Полученные автором данные идут в определенный разрез с общепринятыми представлениями о клетке, как минимальной функциональной единицы жизни, решающее значение для существования которой имеет плазмалемма. Известно, что дефекты плазмалеммы и потеря её целостности неизбежно приводят к гибели клетки, могут вызвать развитие ряда заболеваний. Выполненное диссертационное исследование показывает, что утверждение об исключительной роли плазматических мембран в жизни клеток, признать абсолютным нельзя. Диссертантом представлена доказательная база, подтверждающая, что один из постулатов основ клеточной биологии: «жизнь клетки без плазмалеммы невозможна» не распространяется на все многообразие жизненных проявлений.

В разделе анализируются морфология, распространение, биология развития и влияние рациона питания на изменение габитуса трех видов «фотосинтетических»

моллюсков, использованных для изучения их питания ценоцитными зелеными водорослями. В результате экспериментов выявлен высокий уровень пищевой привязанности определенного вида моллюска к водорослям определенной систематической группы. Автором предполагается, что у каждого вида моллюсков, способных поедать водоросли, имеются «свои» максимально эффективные клептопластиды определенных видов растений, что позволяет говорить об основной стратегии питания, направленной на накопление в пищеварительных клетках моллюсков как можно большего количества неповрежденных хлоропластов. Резервирование последних в качестве запасных веществ позволяет поддерживать жизнеспособность моллюсков в ходе голодания.

Результаты электронно-микроскопического изучения клеток пищеварительной системы элизий дали основание Татьяне Андреевне Ключковой высказать предположение, что пищеварительные клетки моллюсков «захватывают» не отдельные хлоропласты, как считалось ранее, а сгустки водорослевой протоплазмы, включающие все клеточные компоненты, в том числе ядра и хлоропласты, окруженные сетью шероховатого ЭР. Автором по результатам наблюдений был сделан вывод, что все важнейшие компоненты растительной клетки остаются живыми и функциональными в пищеварительных клетках моллюсков. Это позволило ответить на вопрос, волновавший исследователей явления клептопластии много лет: каков механизм длительного функционирования ассимилированных в клетки моллюсков хлоропластов при полном отсутствии водорослевых ядер и других клеточных структур, которые подверглись перевариванию при попадании в клетки животных. В работе приводится доказательная база, что в симбиотических взаимоотношениях ряда представителей ценоцитных зеленых водорослей и заднежаберных моллюсков может присутствовать не только клептопластия - «воровство» хлоропластов, но и клептокариоз «воровство» ядер. Полученные сведения о сохранности жизнеспособности и функциональной активности в пищеварительных клетках моллюсков важнейших клеточных компонентов растительной клетки, позволило диссертанту выдвинуть предположение, что регуляция фотосинтеза клептопластид может обеспечиваться за счет функционирования ядра растительной клетки.

К числу важных результатов исследования несомненно можно отнести вывод, что в протоплазме исследуемых ценоцитных зеленых водорослей, после попадания в пищевод моллюсков и пищеварения, в её полупереваренной массе, после дефекации моллюска, часть органелл остается неповрежденными в виде сгустков. Неповрежденные протоплазматические сгустки дают начало новым протопластам, которые, соответственно, после образования плазматической мембраны и клеточной стенки,

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*. Выявленный феномен несомненно является одним из положительных эффектов описываемого симбиоза.

В разделе Заключение, где подведены итоги экспериментальной и аналитической работы диссертанта, справедливо отмечено, что описываемые симбиотические взаимоотношения разных видов водорослей и моллюсков осуществляются на уровне взаимовыгодного сотрудничества. Автору работы удалось проследить эти взаимоотношения от субклеточного уровня, когда внутри одной биологической клетки взаимодействуют между собой клеточные органеллы, принадлежащие очень далеким в филогенетическом отношении организмам, до популяционного уровня. Нельзя не согласиться с диссертантом, что основой формирования симбиотических связей между водорослями и моллюсками является исключительная способность водорослевой протоплазмы сохранять жизнеспособность, даже в условиях агрессивного биохимического воздействия, её уникальная способность к агглютинации и автономному существованию внутри клетки моллюска.

Симбиотическое сожительство представителей заднежаберных моллюсков и ценоцитных зеленых водорослей, безусловно, является исключительно тесным, весьма эффективным и взаимовыгодным. Первым уникальная способность водорослевой протоплазмы сохранять жизнеспособность позволяет запасать её для длительного хранения и при этом получать по мере её хранения в живом состоянии дополнительные пищевые ресурсы. Вторым сотрудничество с фитофагами обеспечивает возможность вегетативного размножения.

Выводы диссертации хорошо аргументированы, четко сформулированы на основании полученных результатов. Выводы достаточно полно отражают Цель, Задачи исследования, Положения, выносимые на защиту.

В диссертации присутствуют некоторые неточности в формулировках, терминах. Есть вопросы к диссертанту.

## Глава 2 «Материалы и методы»

- 1) Используемый в работе фиксатор почему-то автором всюду называется «глутеровый альдегид» вместо «глутаровый альдегид», коим он является;
- 2) Толщина срезов, подготовленных к просмотру в электронном микроскопе, указана: 150 нм, что составляет 1500 ангстрем. Срезы такой толщины пучок электронов трансмиссионного микроскопа вряд ли пробьет, тем более, если перед просмотром

в микроскопе они дополнительно покрывались углеродной пленкой. По-видимому, автор, ошиблась. Толщина срезов была 15 нм.

#### Главы 3-7

- 3) Насколько правомочно употребление термина «люомен»? (стр. 154, рис. 45) для обозначения группы мембран? Данным термином в литературе принято обозначать пространство между двумя мембранами оболочки клеточного ядра, т.е. перинуклеарное пространство. В подписи к рис. 45-1 значит: «один большой центральный пищеварительный люомен, либо несколько разрозненных (рис. 45-22). Может быть, автор этим термином обозначает вакуоли?
- 4) Что имеется в виду под термином «Люокопласт»? (стр. 136). К сожалению, рецензентам данный термин неизвестен.
- 5) На рис. 47 структуры, обозначенные как липидные капли, скорее можно отнести к постлизосомам. Во всяком случае, по внутреннему содержимому и по размерам.
- 6) Описывая хлоропласты на рис. 50-2: «...морфологические изменения могут указывать на ухудшение их состояния». Состояние хлоропластов ухудшиться не может. Тем более, что морфологических признаков деградации хлоропластов на приведенной фотографии не отмечается. Не исключено, что в данном случае можно говорить о смене энергетического метаболизма, об увеличении функциональной нагрузки на митохондрии (мтх). На рис. 50-1 округлые по форме мтх в поперечнике значительно меньше по размеру, чем мтх на фото 50-2: 0,4 мкм против 1,8 мкм. По мнению рецензента необходимо было уделить внимание не только пластидам, а и второй энергетической структуре клетки – митохондриям.
- 7) Хотелось узнать мнение диссертанта: какой фактор (свойство) определяет избирательность моллюска по отношению к водоросли, как объекту питания?

Отмеченные замечания не умаляют высокого уровня проведенного исследования. Диссертация прекрасно иллюстрирована. Приведенные рисунки, таблицы и фотографии поясняют текст диссертации, отражают высокий уровень достоверности полученных результатов.

Не вызывает сомнений личный вклад Т.А. Ключковой в выполненные исследования. Об этом свидетельствуют детальные описания проведения полевых и лабораторных работ.

Достоверность подтверждается большим числом публикаций представленного в диссертации материала в ведущих международных журналах, выполненных апробаций на научных собраниях самого высокого ранга.

Глубокое знание диссертантом предмета исследования, привлечение к работе широкого методического арсенала, позволило обогатить сразу несколько научных направлений исследований совершенно новыми результатами, положениями, выводами: альгологию, зоологию беспозвоночных, клеточную биологию и, конечно, направление, по которому заявлена диссертационная работа: экологию. Широки возможности практического использования данных результатов: от биотехнологии, развития аквакультуры до включения в информационные материалы лекционных занятий ВУЗов.

Диссертационная работа Т.А. Клочковой является самостоятельным исследованием, соответствует правилам, предъявляемым к докторским диссертациям, ее автор Татьяна Андреевна КЛОЧКОВА, достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.02.08 – Экология (биология).

Отзыв на диссертацию обсужден и утвержден на расширенном семинаре Лаборатории альгологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Мурманского морского биологического института Кольского научного центра Российской академии наук.

Заведующий лабораторией альгологии ММБИ КНЦ РАН  
д.б.н., профессор

Григорий Михайлович Воскобойников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра Российской академии наук  
183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17  
Тел. +7(8152) 253963 Факс: +7(8152) 25-39-94  
[mmbi@info/murman-mmbi@yandex.ru](mailto:mmbi@info/murman-mmbi@yandex.ru)  
28 апреля 2017 г.

Сергиев

Воскобойников

Т.М. Зверева

Нач. отдела кадров  
Фомина