



"Утверждаю"

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук
(БИН РАН)

12 февраля 2018

д.б.н. Д.В. Гельтман

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

- Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН на диссертацию
МАТАНЦЕВОЙ Ольги Валерьевны «Конкурентное поглощение и ассимиляция
органических веществ и нитрат-ионов клетками динофлагеллят *Prorocentrum
minimum*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология,
цитология, гистология

Представляемая к защите диссертация О.В. Матанцевой изложена на 134
страницах формата А4, иллюстрирована 31 рисунком и содержит 10 таблиц.
Структура диссертации традиционна:– состоит из Введения, Обзора
литературы, описания методов и объектов исследования, глав Результаты и
Обсуждение, Заключение, Выводов, Списка литературы, Приложения.

Актуальность предпринятого исследования.

Во Введении автор обосновывает актуальность темы исследования,
формулирует цель и задачи работы. По мнению диссертанта, актуальность
исследования обусловлена несколькими обстоятельствами:

Объект исследования - вид *Prorocentrum minimum*, относится к
динофитовым водорослям (динофлагеллятам). Этот вид широко распространен
в умеренных и субтропических водах; в последнее время быстро и успешно
расселяется по Балтийскому морю. Это один из инвазионных видов, несущих
угрозу стабильности всей прибрежной биоты морских побережий на западе и
востоке страны. Он вызывает «цветение» прибрежных вод, продуцирует
нейротоксины и тем самым представляет угрозу здоровью людей и экономике
прибрежных областей (Anderson, 2009). *Prorocentrum minimum* –

фотосинтезирующий вид, способный к миксотрофному питанию. Как отмечает диссертант, экспансия динофлагеллят и их цветений, наблюдаемая в последнее время, по-видимому, связана именно с особенностями питания этих организмов. В частности, способность эффективно поглощать и ассимилировать органические соединения и, прежде всего, такие широко представленные в прибрежных водах вещества, как нитриты, нитраты, мочевины, аминокислоты дает *Prorocentrum minimum* конкурентные преимущества в условиях антропогенной эвтрофикации эстуариев рек и мелководных морских заливов.

В этой связи, становятся актуальными исследования физиологии и клеточных механизмов питания динофлагеллят и, в частности, *Prorocentrum minimum*. Так, требуют исследования процессы и механизмы питания динофлагеллят в среде, где мочевина, глицин и нитрат-ионы присутствуют в высокой концентрации, что характерно для многих современных прибрежных урбанизированных экосистем. Кроме того, диссертант отмечает, что наличие нескольких неаннотированных транскриптомов динофлагеллят сделало возможным изучение комплекса генов и белков, обеспечивающих поглощение и ассимиляцию питательных субстратов динофлагеллятами. Эти вопросы ранее никогда не исследовались на таких объектах, как *P. minimum* с его преимущественно фототрофным метаболизмом. Проведение таких исследований – актуальная и важная задача.

На основании вышеизложенного диссертант формулирует цель и задачи проведенного исследования:

Целью работы было изучение процессов и клеточных механизмов поглощения и ассимиляции органических веществ (мочевины и глицина и нитрат-ионов клетками динофлагеллят *P. minimum*).

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить конкурентный транспорт азота мочевины и нитрат-ионов, а также азота глицина и нитрат-ионов в клетки динофлагеллят *P. minimum* в условиях избыточного содержания азота в среде.
2. Оценить роль мочевины и глицина как источников углерода для биосинтетических процессов в клетках *P. minimum*.
3. Идентифицировать гомологи белков, вовлеченных в поглощение и начальные этапы метаболизма нитрат-ионов, мочевины и глицина, у динофлагеллят *P. minimum* с помощью анализа транскриптомных баз данных.

Очевидно, что задачи, которые поставил перед собой диссертант, вполне соответствуют заявленной цели исследования. Разумность и обоснованность поставленной задачи и целей исследования и актуальность предпринятого диссертантом цикла работ не вызывают у нас никаких сомнений.

Анализ текста диссертации.

Глава «Обзор литературы» логична по подбору материала, показывает хорошую теоретическую подготовку диссертанта как цитолога-протистолога, специалиста в области биологии клетки. Этот раздел диссертации компактен, занимает всего 22 страницы текста. В первом параграфе этой главы диссертант кратко касается положения Dinoflagellata среди других эукариот, касается особенностей организации их клеток. Затем дается обзор физиологии питания динофлагеллят. Рассмотрев имеющиеся в литературе данные диссертант делает вполне обоснованный вывод о том, что сведения о питании динофлагеллят фрагментарны и чаще всего представляют собой описание способности тех или иных видов к ассимиляции различных соединений. Клеточные механизмы процессов питания динофлагеллят остаются совершенно неизученными. По мнению диссертанта, последнее обстоятельство связано, прежде всего, с тем, что большие размеры геномов динофлагеллят препятствуют полногеномному секвенированию и, соответственно, нет или почти нет данных о генах и белках, участвующих в транспорте и метаболизме питательных веществ.

Отдельная глава посвящена основному объекту исследований – виду *Prorosentrum minimum*.

Интересны и информативны разделы обзора литературы, посвященные органическим веществам в морских экосистемах и месте, которое они занимают в питании динофлагеллят. Диссертант отмечает, что некоторая противоречивость имеющихся данных о роли мочевины и глицина в питании динофлагеллят связана с тем, что эти вопросы изучались, главным образом, в полевых исследованиях «цветений» отдельных видов, что предполагает высокую вариабельность условий среды, а также смешанное микробное сообщество.

Отдельная глава Обзора литературы посвящена новому направлению в протистологии - изучению экофизиологии фотосинтезирующих простейших, проводимых на уровне отдельных клеток. Глава, как и весь обзор литературы, написана ярко и интересно.

В целом, Обзор литературы показывает характерное для научного почерка диссертанта хорошее владение предметом, ясное понимание целей и задач исследования. Особо надо отметить высококачественные рисунки, органично включенные в текст Обзора литературы.

В диссертации, как квалификационной работе, важное значение имеет глава 2 «Материалы и методы». Анализ ее показывает, что за время работы над диссертацией О.В. Матанцева овладела методами культивирования динофлагеллят, освоила многие методы аналитической химии, методы колориметрии, масс-спектрометрии, масс-спектрометрии вторичных ионов в наномасштабе, она владеет современными методами статистической обработки результатов измерений.

Особое пионерское направление исследований, требующее особой подготовки - аннотирование транскриптомов *Prorocentrum minimum*, направленное на выявление генов, продукты которых могут участвовать в транспорте и метаболизме нитрат-ионов, мочевины и глицина.

В целом, раздел «Материалы и методы» показывает высокий уровень профессиональной подготовки диссертанта, как клеточного биолога.

Обратимся теперь к главам «Результаты» и «Обсуждение». Несомненно, это лучшая часть работы. Исследуя конкурентный транспорт нитрат-ионов и органических азотсодержащих веществ в клетки *P. minimum* с использованием субстратов, меченных стабильными изотопами азота и углерода, диссертант показал, что в условиях избыточного содержания азота в среде мочевины и глицин являются предпочтительными источниками азота по сравнению с нитрат-ионами. Интересна впервые показанная закономерность: появление азота мочевины в среде в концентрации равной концентрации нитрат-ионов приводит к уменьшению (подавлению ?) транспорта последнего в клетку. При этом показано, что глицин и мочевины составляют лишь малую часть углеродного питания *P. minimum*, при этом процесс ассимиляции этих соединений связан с разобщением ассимиляции углерода и азота этих соединений. 4) данное разобщение может быть объяснено наличием у исследуемых организмов транспортных и метаболических процессов, предсказываемых биоинформатическими методами; 5) клетки из одной и той же популяции *P. minimum* демонстрируют существенную вариабельность в отношении поглощения одних и тех же питательных субстратов. Важно отметить, что последний результат был получен с помощью новейшего метода, позволяющего оценить изотопный состав отдельных клеток, - NanoSIMS.

Особое направление исследований диссертанта - анализ транскриптомов *P. minimum* с целью выявить гомологи белков, участвующих в транспорте и ассимиляции нитрат-ионов, мочевины и глицина. Диссертанту удалось показать, что в геноме *P. minimum* есть гомологи генов, участвующих в транспорте нитратов (NRT1.2, NRT2.1, CLCa), транспорте мочевины (PIP, NIP, TIP, DUR3), транспорте глицина (CAT1, GLYT), метаболизме нитратов (NAR, NIR), метаболизме мочевины (URE), метаболизме глицина (GDC, SHMT). Среди продуктов этих генов есть белки-транспортеры, каналы и аквапорины, участвующие в пассивном трансмембранном транспорте, а также ферменты, ответственные за метаболизм нитрат-ионов, мочевины и глицина в клетке. В то же время, у *P. minimum* не были найдены гены, продукты которых были бы гомологичны важнейшим транспортерам глицина у растений – белкам AAP.

В целом, этот раздел производит очень хорошее впечатление. Однако из текста диссертации не ясно, почему в качестве референс-геномов были взяты транскриптомы *Arabidopsis* и человека, а не аннотированные транскриптомы других динофлагеллят, например таких, как *Scrippsiella trochoidea* (Cooper et al., 2016 Analysis of *Scrippsiella trochoidea* CCMP 3099 reveals physiological changes related to nitrate depletion // Front. Microbiol., 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00639>) или *Amphidinium carterae* (Lauritano et al. 2017. De novo transcriptome of the cosmopolitan dinoflagellate *Amphidinium carterae* to identify enzymes with biotechnological potential// Scientific Reports. 2017. 7: 11701 | DOI:10.1038/s41598-017-12092-1). Доступны транскриптомы и других Alveolata – было бы интересно сравнить полученные результаты и с ними.

Объем выполненной работы, разнообразие методов, современность статистической обработки данных, убедительные графики и схемы – все выполнено на очень высоком современном уровне.

В главе «Обсуждение» диссертант проводит всесторонний анализ полученных результатов, вновь демонстрируя высокий уровень теоретической подготовки и знание предмета исследований. В частности, О.В. Матанцева обсуждает возможные механизмы разобобщения ассимиляции азота и углерода мочевины и глицина и возникновения наблюдаемой гетерогенности клеточных популяций *P. minimum*. Важно подчеркнуть, что данные, полученные в ходе работы, обсуждаются с точки зрения их экологического значения. Например, разобобщение ассимиляции азота и углерода мочевины и глицина у динофлагеллят, по мнению автора, следует рассматривать как дополнительный путь реминерализации органического вещества в морских экосистемах.

Теоретическая и практическая значимость проведенного исследования не вызывает никаких сомнений. Полученные диссертантом данные заметно дополняют имеющиеся представления о клеточных механизмах питания динофлагеллят и о динамике их природных популяций. Данные о вариабельности индивидуальных клеток *P. minimum* по признаку поглощение и ассимиляция органических и неорганических субстратов интересны в связи с изучением физиологической и эволюционной роли гетерогенности популяций простейших в природе.

Результаты представляемой к защите работы могут быть полезны при разработке методов борьбы с цветением в прибрежных водах. Результаты этой работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов, специализирующихся на кафедрах зоологии беспозвоночных, цитологии, клеточной биологии, генетики и биотехнологии.

В работе отработаны, опробованы несколько экспериментальных подходов, которые могут быть полезны для мониторинга состояния природных популяций простейших с целью сохранения их генетического разнообразия.

Текст диссертации написан хорошим языком, ясно и просто. В работе много интересных, по-настоящему новых, иногда неожиданных результатов и выводов. Это яркий пример исследования, выполненного высококвалифицированным цитологом, работающим в области протистологии.

Результаты представляемого к защите исследования опубликованы в нескольких авторитетных рецензируемых журналах и неоднократно обсуждались на представительных отечественных и международных конференциях. Положения, выносимые на защиту и определяющие выводы из работы, обоснованы полученным материалом и представляются достоверными.

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Актуальность и новизна предпринятого О.В. Матанцевой исследования, его соответствие планам фундаментальных исследований и основных направлений в российской науке, корректность выводов и положений, выносимых на защиту не вызывает никаких сомнений. Результаты этой работы уже сейчас известны специалистам цитологам и протистологам и, несомненно, будут востребованы в будущем.

Диссертация Ольги Валерьевны Матанцевой, представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология действительно является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи,

имеющей важное значение для развития цитологии как науки, в ней впервые предложено научно обоснованное решение важной проблемы, связанной с исследованием клеточных механизмов питания динофлагеллят.

Диссертация обладает внутренним единством и содержит новые, обоснованные личными наблюдениями и расчетами научные результаты и положения, свидетельствующие о личном вкладе автора О.В. Матанцевой в науку. Тем самым, представленная к защите кандидатская диссертация О.В. Матанцевой «Конкурентное поглощение и ассимиляция органических веществ и нитрат-ионов клетками динофлагеллят *Prorocentrum minimum*», соответствует критериям, установленным в пунктах 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертант заслуживает присуждения ему ученой степени кандидат биологических наук по специальности 03.03.04— клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биосистематики и цитологии БИН РАН,
профессор

Александр Викентьевич Родионов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, дом 2, тел./факс +7
(812) 372-54-43

Avrodionov@binran.ru

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного семинара лаб.
биосистематики и цитологии БИН РАН 9 февраля 2017 г.

Секретарь семинара, кандидат биологических наук,
научный сотрудник

Николай

Николаевич Носов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, дом 2, тел./факс +7
(812) 372-54-43

nnosov2004@mail.ru

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ

ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

