

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Чадовой Ксении Андреевны

«ЛИПИДОМ МАКРОФИТА *UNDARIA PINNATIFIDA* И ЭНДОФИТНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПОРЯДКА *ECTOCARPALES*: ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

Актуальность выбранной темы. Липидомные исследования являются бурно развивающимся направлением современной биохимии, поскольку имеют целью не только определение состава классов липидов, но и молекулярных видов индивидуальных классов. Это, в свою очередь, позволяет делать заключение о путях биосинтеза липидов, а также способствуют нашему пониманию физиологической роли липидов в меняющихся условиях окружающей среды, а также в процессе развития организма. В связи с этим, липидомный подход очень полезен как для решения фундаментальных вопросов, так и прикладных задач, направленных на повышение продукции ценных компонентов. Бурые водоросли различаются по жизненным формам, экологическим нишам и зачастую являются ценозообразующими видами морских экосистем. Некоторые виды имеют хозяйственное значение, в том числе и как продуценты полиненасыщенных жирных кислот. Объектами исследования К.А. Чадовой были бурые водоросли разных жизненных форм: макрофит *Undaria pinnatifida* и нитчатые эпи-/эндофиты *Laminariocolax aecidioides* и двух видов рода *Streblonema*. *U. pinnatifida* является пищевым растением и имеет экономическое значение, тогда как нитчатые эндофиты поселяются в тканях макроводорослей, включая *U. pinnatifida*. Заселение макрофитов эндофитными водорослями может сказываться на их физиологическом состоянии, менять компонентный состав слоевища хозяина, в том числе за счет собственных компонентов, и, кроме того, ухудшать товарный вид промысловых видов водорослей. Вместе с тем, разработаны методы культивирования эндофитных водорослей в свободном виде, что делает их потенциальными объектами биотехнологии (Skriptsova, 2017), чей компонентный анализ необходимо исследовать для дальнейшего использования. Хотя *U. pinnatifida* является хорошо исследованным растением с точки зрения состава липидов и особенно жирных кислот (Khotimchenko, 1998; van Ginneken et al., 2011; Boulom et al., 2014), полный липидом не был представлен в литературе. Таким образом, тема диссертации Ксении Андреевны является актуальной, а поставленная цель, включающая установление липидомов бурых водорослей и их изменения под влиянием абиотических и биотических

факторов, **имеет важное научное значение** для понимания механизмов адаптации этих растений.

Общая характеристика работы. Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и четырех приложений. Работа изложена на 212 страницах, содержит 4 таблицы, 55 рисунков, 330 литературных источников, 4 приложения. Во введении (5 стр.) обоснована актуальность темы и степень её разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, дано обоснование достоверности полученных результатов, представлена информация об апробации и программах финансирования исследования, указан личный вклад автора.

В обзоре литературы (33 стр.) автор дает общее представление о сложных липидах, оксипипинах и стеринах водорослей, с указанием их структур, путей биосинтеза, биологической роли и прикладном значении. **На мой взгляд, автор излишне подробно рассматривает стерины в разделе Стероиды (5 стр.), хотя в основной части (обсуждении результатов) они совсем не рассматриваются. Предпочтительнее было бы более подробное рассмотрение сфинголипидов водорослей, в частности, анализируемого в работе церамидфосфоинозита.** Отдельный раздел обзора посвящен влиянию абиотических (температура, освещение, минеральное питание) и биотических (эпи- и эндофитные организмы) факторов на состав липидов водорослей. Впрочем, влияние эпи- и эндофитизма осталось нераскрытым: в разделе даны самые общие представления об этом явлении, а липиды упомянуты только в связи с защитной реакцией водорослей на заселение посторонним организмом, которое выражалось в накоплении свободных жирных кислот и оксипипинов, а также изменении активностей связанных с ними ферментов. Видимо, это вызвано недостатком литературных данных, однако вместо указания на недостаток данных автор заканчивает раздел расплывчатым заявлением: «В других подобных исследованиях были получены схожие результаты, но только в одном из них использовался липидомный подход», при этом в приведенной ссылке (Kumari et al., 2015) ничего нет про эндофитизм. Завершает обзор литературы раздел с характеристиками объектов исследования – *U. pinnatifida*, *Laminariocolax aecidioides* и *Streblonema corymbiferum*. Такой раздел является полезным, поскольку знакомит читателя с особенностями морфологии, биологии и экологии исследованных видов. Для первого объекта также приведены известные данные по его липидному составу. К сожалению, в обзоре литературы нет краткого заключения, который бы суммировал литературные

данные и, вместе с тем, предварял основную часть диссертации: что известно и что необходимо выяснить для понимания липидного обмена бурых водорослей. Здесь можно было бы еще раз подчеркнуть и недостаточность исследования обмена липидов при эпи- и эндофитизме, и липиды самих эндофитов; для *U. pinnatifida*, несмотря на хорошую изученность вида, указать на отсутствие данных о молекулярных видах липидов.

Раздел «Материалы и методы» (9 стр.) описывает объекты и методы исследования в соответствии с требованиями, предъявляемыми к научным публикациям. Содержание раздела удачно дополнено Приложением 1 (7 стр.), где наглядно показаны примеры масс-спектров и схемы фрагментации соответствующих липидов. Из раздела осталось неясным, как всё-таки определяли количества классов липидов, приведенные в последующих таблицах и в приложениях, методом тонкослойной хроматографии или ВЭЖХ-МС/МС? Одномерная ТСХ едва ли позволяет корректно оценить уровень минорных липидов, а для ВЭЖХ-МС/МС не приведены калибровочные кривые, коэффициенты или другие детали расчетов.

Основной раздел диссертации – «Результаты и обсуждение» (54 стр.) – разделен на пять частей: в первой части приведены результаты анализа липидов *Undaria pinnatifida*; во второй части – липидный состав эндофитных водорослей; в третьей части – влияние температуры и освещенности на липидный состав двух видов рода *Streblonema*, выращенных в свободном виде; в четвертой части представлена сезонная динамика липидного состава *U. pinnatifida*; в пятой – липидный состав *U. pinnatifida* при инфицировании эндофитом *Laminariocolax aecidioides*. Такое расположение материала, видимо, связано с хронологией исследований и/или публикаций по теме, но для понимания материала представляется запутанным. На мой взгляд, логичнее было бы сначала рассмотреть липидом *U. pinnatifida*, в том числе его сезонную динамику и изменения под действием *Laminariocolax aecidioides*. Далее показать липидом *L. aecidioides*, поскольку состав этой водоросли может отражаться в липидоме зараженного хозяина. Затем для сравнения липидомы двух других нитчатых эндофитов из бурых водорослей – *Streblonema corymbiferum* и *Streblonema* sp. И наконец, влияние температуры и света на липидомы двух последних эндофитов. В совокупности все эти результаты дают желаемую картину биосинтеза липидов в бурых водорослях, которая в представленном виде диссертации показана уже во второй части.

Разделы хорошо иллюстрированы, на многочисленных графиках представлены основные результаты, тогда как исходные данные вынесены в отдельные приложения. Автор проявила хорошее умение анализа больших массивов данных с расстановкой акцентов на основных показателях.

В диссертации отсутствует общее заключение по результатам исследований, которое бы подчеркивало общие черты и отличия липидомов макроводоросли *U. pinnatifida* и нитчатых эндофитов, сезонные изменения ундарии и влияние температуры и освещенности в случае свободноживущих *Streblonema*. В заключении можно было бы дать практические рекомендации по оптимальным условиям выращивания или времени сбора исследованных видов бурых водорослей с целью максимального выхода ценных полиненасыщенных жирных кислот, в частности эйкозапентаеновой кислоты, или конкретных молекулярных видов сложных липидов, в чей состав такие кислоты входят.

Выводы основаны на результатах, полученных в ходе исследования, и соответствуют положениям, выносимым на защиту. Необходимо заметить, что **вывод 1 (и 1-е положение) о происхождении глицеролипидов из пластидного или эндоплазматического пула подтверждает литературные данные, полученные для других видов бурых водорослей** (см. Jones, Harwood, 1992 [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83693-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83693-S); Hofmann, Eichenberger, 1997 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029270>), однако в тексте диссертации эти данные не приведены. Есть замечание к выводу 4 (см. ниже).

Список литературы включает 330 ссылок. **Главное замечание к оформлению списка литературы (и всей диссертации) касается названий журналов.** Автор дает полные названия журналов без сокращений. Есть общепринятые правила сокращений названий иностранных журналов, которым необходимо следовать при написании научных публикаций, в том числе диссертационных работ. Отечественные журналы на русском языке часто пишут полностью, однако и в этом случае не пишут все слова названия с заглавной буквы, как у Ксении Андреевны в диссертации: «Биология Моря», «Физиология Растений».

Завершает диссертацию приложения, которые в общей сложности составляют более трети всего объема диссертации (79 стр.!). Приложения 2–4 включают обширный исходный фактический материал полученных результатов. Получение и статистическая обработка такого большого объема впечатляет, безусловно подтверждает достоверность исследования, а полученная информация представляет ценный справочный материал по липидому бурых водорослей для специалистов в этой области.

Диссертационная работа К.А. Чадовой написана в хорошем научном стиле, хотя не лишена замечаний. Среди наиболее существенных необходимо указать следующие:

1) Фразы, предваряемые словом «известно», должны подкрепляться соответствующими ссылками (см., например, стр. 62, последний абзац, 1-е и последнее предложения, стр. 76, 2-й абзац, 1-е предложение).

2) Стереоспецифическое положение ацильных остатков (*sn* от 'stereospecific numbering') следует выделять курсивом (по всему тексту).

3) Избегать возвратных глаголов, например: соотношение варьирует вместо «варьируется» (стр. 11, 2-й абзац); «Верхние части листовой пластины образцов просматривались на наличие» (стр. 44, 1-й абзац); «на основе этих данных идентифицировались молекулярные виды» (стр. 51); «Для анализа использовались» и «Пониженное содержание ЦФИ наблюдалось» (стр. 100) и т.д.

4) В разделе 1.1.6 Стероиды для одного и того же соединения использованы названия «эргостерол» (в тексте) и «эргостерин» (рис. 6). В общем, названия в одной работе должны быть единообразными: если речь идет о «стеринах», то все стерины должны иметь окончание –ин, а не –ол.

5) Замечания к рисункам. Рис. 1: Неправильно показаны конфигурации гликозидных связей для второго галактозила в ДГДГ (должна быть α -гликозидная связь), сульфохиновозила в СХДГ и глюкуронозила в ГКДГ (должны быть α -гликозидные связи). Подпись к Рис. 40, стр. 91: «db – количество двойных связей в брутто формуле C:db (C – количество атомов углерода)» не соответствует обозначениям на самом рисунке, где указаны только db. Рис. 49, стр. 101: смещение звездочек над столбцами графика. На большинстве рисунков излишне даны полные латинские названия водорослей, родовые названия *Laminariocolax aecidioides* и *Streblonema corymbiferum* достаточно сократить до одной буквы. Другие обозначения на рисунках было бы достаточно дать один раз на одном из первых и в последующем ссылаться на него.

б) Некоторые утверждения и фразы некорректны или требуют уточнения или подтверждения литературными ссылками. (1) Литературный обзор, стр. 11, 3-й абзац: «Содержание СХДГ в фотосинтетических мембранах незначительно». Однако СХДГ составляет до 25% всех гликолипидов, в том числе по результатам анализа автора работы, что нельзя назвать как незначительное содержание. (2) Стр. 32, 2-й абзац. Фраза «Анализ молекулярных видов липидов показал существенные различия распределения ЖК липидов в зависимости от сезона, причем наибольшие изменения наблюдались у деацилированных форм (Moreira et al., 2020)» некорректная. Какие различия распределения ЖК могут быть у деацилированных форм? (3) Стр. 36: Заключение «Таким образом, никакой корреляции между длиной световой волны и уровнем содержания липидов в отдельных видах водорослей не прослеживалось.» противоречит предыдущим предложениям. (4) Стр. 38, предложение: «Так, в арабидопсисе ДГДГ может заменять до 80% мембранных ФЛ (Andersson et al., 2003).» – в статье речь идет об овсе, а не арабидопсисе. (5) Стр. 89, последний абзац. Отсутствует ссылка на литературный

источник в утверждении: «...свидетельствует об усилении синтеза ЖК de novo и подтверждает роль ДГТС как субстрата для первичной экстрапластидной десатурации ЖК». (6) Также на стр. 92: «МГДГ является сильно ненасыщенным небислойным липидом и ассоциирован с белками фотосистем (Jordan et al., 2001; Loll et al., 2005), а СХДГ – насыщенным, и в меньшей степени связан с фотосинтетическим аппаратом.» – нет подтверждающей ссылки.

7) Сокращения и аббревиатуры. Стр. 38: Сокращение ЭПК довольно часто использовано в тексте, но в списке сокращений его нет. Также некоторые другие сокращения (JA). Аббревиатуру ФАО во Введении (стр. 6) следовало расшифровать.

8) Описание методов. Стр. 44, 1-й абзац: перепутаны обозначения для элюента Б, ниже идет как В. Стр. 50, предпоследнее предложение: «ион ДГТС дает интенсивные продукты [M+Li-74]⁺ и [M+Li-74]⁺» – даны два одинаковых иона. Стр. 49 (п. 2.4) и 52 (п. 2.7): Где-то указан только поток, где-то только доля элюента. Не указано, как собирали фракции. Стр. 52, п. 2.8. В предложении «При анализах использовались данные не менее трех измерений» не ясно, что подразумевается под измерениями – три образца или три измерения в одном образце. Также в таблицах приложений «Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение при тройном повторе», что подразумевается под «повторами»?

9) Единообразие в выражении содержания липидов. Сперва состав классов полярных липидов дан в % от суммы ГЛ или суммы ФЛ (рис. 13 (стр. 54) и рис. 16 (стр. 59)), затем от суммы полярных липидов (рис. 20 (стр. 66), приложение 4, табл. 1), что вносит путаницу при сравнении результатов разных разделов. При этом, последний вариант (от суммы ПЛ) более предпочтительный, поскольку наглядно показывает соотношение всех классов липидов (ФЛ и ГЛ). В идеале необходимо стремиться к выражению содержания классов липидов в абсолютных величинах (молярных или весовых на единицу массы образца, откуда их извлекали). Результаты могут оказаться очень неожиданными и интересными.

10) Излишний акцент на изменение минорных молекулярных видов (НЖК/НЖК ФГ, стр. 96; 20:4/20:3 ФХ, стр. 97).

11) Опечатки в оформлении списка литературы (например, ссылки 85, 169). Несмотря на полное написание названий журналов, непериодическое издание оказалось зашифрованным (ссылка 77): Encyclopedia of Life Sciences сокращена до eLS.

Эти замечания не умаляют значимости и достоинств диссертации и приведены здесь в воспитательных целях, чтобы исследователь обращала внимание в будущем на подобные моменты.

При знакомстве с работой возникли некоторые вопросы и дополнительные замечания:

- 1) Материалы и методы, табл. 1. Действительно температура в Амурском заливе в апреле составляла 0°C?
- 2) Материалы и методы, стр. 46: Как гомогенизировали образцы ткани в 5 мл смеси хлороформа и метанола? Как с помощью фильтровальной бумаги собирали органическую фазу в грушевидные колбы?
- 3) Раздел 3.3.4, стр. 83. Один из вариантов влияния интенсивности света на липидный состав водорослей предполагает интенсивность света 0, т.е. выращивание в темноте в течение 3 недель. Т.к. это довольно продолжительный срок отсутствия фотосинтеза, то растения в таких условиях должны быть в очень подавленном состоянии, граничащим с гибелью. В связи с этим вопросы: 1. Был ли какой-то дополнительный источник углерода в среде ES, в которой культивировали эндофиты, который они могли бы использовать для поддержания жизнедеятельности? 2. Как выглядели растения после такого культивирования? 3. Есть ли какие-то результаты по содержанию общих липидов?
- 4) 3.3.4 Влияние интенсивности света... Стр. 89: Утверждение «Динамика содержания молекулярных видов ФХ было сходной с таковой у МГДГ и ДГДГ, что подтверждает роль ФХ как донора ПНЖК для пластидных липидов.» выглядит неубедительным, поскольку все эти липиды сильно отличаются по главным молекулярным видам.
- 5) 3.4 Сезонная динамика липидного состава *Undaria pinnatifida*. Утверждения автора, которые представляются спорными: «В феврале, вследствие удлинения фотопериода, происходит усиление фотосинтеза, но недостаток кислорода, вызванный наличием ледового покрова, не позволяет полностью использовать продукты фотосинтеза для роста.» (Стр. 91) – более правдоподобно выглядит сдерживание роста из-за низкой температуры воды, потому что между февралем и апрелем существенной разницы нет как для ТАГ, о котором идет речь, так и для других липидов. «В верхних участках изменение содержания ФЭ, ФХ и ФГЭГ были незначительным.» – хотя как следует из рис. 41, доля ФЭ существенно увеличивалась в декабре. «Молекулярный состав ФИ практически не изменялся в разные месяцы» – хотя как следует из табл. 3, приложения 2 существенные изменения наблюдали для 16:0/18:2; 16:0/18:1 (главный мол. вид) в верхних частях водоросли. Стр. 99: Предпоследний абзац о путях образования ТАГ в *U. pinnatifida* не совсем ясно изложен, поскольку из него следует, что основная часть ТАГ образуется из ДАГ полярных липидов, а вывод сделан, что аналогичную картину наблюдали и для ТАГ эндофитов. Тогда как ранее для эндофитов сказано, что у них запускались разные источники ЖК при разных температурах (стр. 78) и при разном освещении (стр. 89).

6) Природа церамидфосфоинозита в бурых водорослях. По мнению К.А. Чадовой, ЦФИ является экзогенным и происходит из грибов или красных водорослей, поселяющихся на поверхности или внутри бурой водоросли (стр. 54). Поэтому любое вытеснение этих эндофитов другим эндофитом, как это происходит в случае инфицирования *U. pinnatifida* нитчатой бурой водорослью *L. aecidioides*, будет способствовать вытеснению ЦФИ-содержащего организма и уменьшение доли ЦФИ (стр. 99-100). Это спорное утверждение. Во-первых, сами эндофитные бурые водоросли, исследованные автором, содержали ЦФИ до 1,4% от суммы полярных липидов (приложение 3, табл. 1, приложение 4, табл. 1), что является слишком высоким уровнем для вклада со стороны постороннего организма. Во-вторых, кроме упомянутой автором работы, где ЦФИ был обнаружен в бурой водоросли (Vyssotski et al., 2017), для другой бурой водоросли описан более сложное гликозилированное производное, ядром которого является ЦФИ (Cacas et al., 2013 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.002>).

7) Вывод 4 (стр. 107) сформулирован не совсем корректно, потому что из него следует, что повышенное содержание как полиненасыщенных жирных кислот в структурных фосфолипидах, так и насыщенных жирных кислот в триглицеридах *U. pinnatifida*, зараженной эндофитом *Laminariocolax aecidioides*, является признаком вторичной инфекции. Хотя в обсуждении результатов речь идет только о насыщенных ТАГ, как возможном признаке вторичной инфекции.

Главным достоинством диссертационной работы Ксении Андреевны являются выполнение исследований на высоком методическом уровне с использованием современных аналитических методов, большой объем полученной информации и комплексный подход при исследовании липидомов бурых водорослей. Это свидетельствует о высокой профессиональной квалификации исследователя и гарантирует научную значимость результатов. Полученные полные липидомы нескольких видов бурых водорослей позволил соискательнице предложить пути биосинтеза их липидов, а исследование факторов внешней среды (температура, освещение), сезонных изменений и заражения эндофитом дают возможность оценить диапазон изменений липидомов этих водорослей и возможные механизмы адаптации растений к неблагоприятным факторам среды. Всё это в совокупности составляет новизну, теоретическую и практическую значимость работы К.А. Чадовой. Можно ожидать, что исходные результаты по липидому водорослей, данные в приложениях, будут полезными в сравнительных исследованиях и послужат основой для дальнейшей аналитической обработки. Поэтому рекомендовал бы автору опубликовать эти результаты на специализированных интернет-ресурсах для более широкого доступа для сторонних специалистов.

Достоверность полученных результатов основывается на использовании современных методов анализа (различные виды хроматографии, масс-спектрометрические методы), повторности измерений и статистической обработкой результатов и сравнение с литературными данными. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Science Citation Index или Science Citation Index Expanded, а также Scopus, апробированы на международных, российских и внутриинститутской конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации и включает все результаты, на основе которых автор формулирует выводы.

Считаю, что по степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости, а также по объему и содержанию диссертационная работа «Липидом макрофита *Undaria pinnatifida* и эндофитных водорослей порядка *Ectocarpales*: характеристика и влияние среды» отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с пунктами 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства №842 от 24.09.2013 г., а её автор, Ксения Андреевна Чадова, заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:



Э.В. Некрасов

Некрасов Эдуард Витальевич

кандидат биологических наук (специальность 03.01.04 – Биохимия),

старший научный сотрудник АФ БСИ ДВО РАН

Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Ботанического сада-института Дальневосточного отделения Российской академии наук
(АФ БСИ ДВО РАН)

675000 Амурская область, г. Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 2-й км,

телефон: +7(4162)209509, e-mail: ed_nekrasov@mail.ru

12 января 2024 г.

Подпись Э.В. Некрасова заверяю:

Заместитель директора АФ БСИ ДВО РАН, к.б.н.



И.М. Котельникова