

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института общей генетики

им. Н.И. Вавилова РАН

профессор



Янковский Н.К.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Паньковой Марины Владимировны

"Структура и эволюция генов гормона роста лососевых рыб (Salmonidae)"
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07. – генетика.

Лососевые рыбы сем. Salmonidae – древняя таксономическая группа, широко распространенная в северном полушарии, где демонстрирует значительное экологическое разнообразие. В силу своего важного хозяйственного значения и, следовательно, досконального знания разнообразных аспектов биологии, а также адаптивной пластичности, обеспечивающей успех интродукций по всему миру, лососевые рыбы являются отличным модельным объектом для проведения исследований в области сравнительной геномики, для изучения микроэволюционных процессов и видообразования, тонкой структуры и функций отдельных генов и их групп, анализа геномной архитектуры комплексных фенотипических признаков, а также многих других генетических и физиологических исследований. Поскольку геном лососевых представляет редкий пример автотетраплоидизации, случившейся как минимум 25 млн назад, и последовавшей за ней диплоидизации, отдельный интерес представляет исследование дивергенции и функциональных характеристик возникших в результате дубликации множественных неаллельных форм генов, что стало возможным благодаря стремительному развитию молекулярно-генетических методов и накоплению

значительного массива данных по различным участкам генома. Среди представителей дублированных генов - гены гормона роста, которые играют важнейшую роль во многих регуляторных, метаболических и онтогенетических процессах. Исследования вопросов структуры, функций и регуляции генов гормона роста у лососевых рыб имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение для биотехнологии и аквакультуры. Однако, несмотря на кажущееся обилие данных, в настоящее время подробно исследованы полные последовательности генов гормона роста лишь у некоторых наиболее коммерчески значимых видов, а сведения по ряду других видов представлены отдельными фрагментами, преимущественно интронными последовательностями, использующихся, как правило, в качестве маркеров для филогенетических реконструкций. Очевидно, что разработка проблемы эволюции генов гормонов роста в семействе Salmonidae и, в более широком ключе, за его пределами должны опираться на максимально подробные данные. Исследованию последовательностей генов гормона роста у четырех дальневосточных представителей рода *Salvelinus*, а также сравнительному анализу подробной структуры дивергенции паралогов и ортологов (у представителей семейства Salmonidae), оценке роли отбора на различных участках генов и вопросам филогении семейства посвящена рассматриваемая диссертационная работа Паньковой Марины Владимировны. Таким образом, актуальность выбранной автором темы, посвященной исследованию структуры и эволюции генов гормона роста у видов сем. Salmonidae, не вызывает никаких сомнений.

Анализ структуры и механизмов дивергенции кодирующих и не кодирующих участков последовательностей генов гормона роста у лососевых рыб, проделанный в работе Паньковой Мариной Владимировной, представляет собой интересное и разносторонне исследование изучаемого вопроса. В работе используются современные молекулярные методы, позволяющие исследовать протяженные последовательности структурно-функциональных областей генома. Диссертация тщательно оформлена, экспериментальный материал наглядно проиллюстрирован. Работа изложена по традиционному плану и содержит разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение и Выводы. Работа имеет достаточный объем в 140 страниц, включая список цитированной литературы (174 наименования, из которых 167 на иностранных языках), 20 рисунков и 32 таблицы, а также 1 приложение.

Первый раздел – Введение содержит всю необходимую информацию о работе: здесь обосновывается актуальность работы, ставятся цели и задачи работы, приводится степень разработанности проблемы, утверждается научная новизна, теоретическое и практическое

значение работы, даются сведения об использованных методах исследования, о положениях, выносимых на защиту, степени достоверности результатов. Также определяется личный вклад автора. Этот раздел, в котором изначально предполагается выверенность формулировок, вызвал несколько вопросов, впрочем, незначительных. Во-первых, обращает внимание некоторое несоответствие масштабов, заданных названием работы (Структура и эволюция генов гормона роста **лососевых рыб**) и её целью (сравнение структуры и дивергенции генов гормона роста у **видов гольцов рода *Salvelinus***). С учетом того, что в перечень необходимых для реализации цели задач входил сравнительный анализ последовательностей генов гормона роста видов лососевых с помощью имеющихся литературных данных, очевидно, цель могла бы быть сформулирована несколько более шире. Также были найдены некоторые противоречия: в одной части раздела указано, что в большинстве групп позвоночных животных ген гормона роста представлен одной копией, в другой – что во многих группах позвоночных гены гормона роста являются дублированными. Также в этом разделе автор употребляет словосочетания «разнонаправленный отбор», «направленность отбора», что не совсем верно, так как в работе не было обнаружено признаков собственно направленного отбора. Далее в Результатах, Обсуждении и Выводах автор использует только термин «отрицательный/ очищающий отбор».

Обзор литературы посвящен подробному описанию истории изучения гормона роста, результатам исследования функции гормона роста, структуры кодирующих его генов у человека и животных, сравнению оценок скорости эволюции в различных таксономических группах. Обсуждаются различные сценарии эволюции дублированных генов, связанных с утратой функциональности, диверсификацией или приобретению новых функций. Подчеркивается уникальность лососевых рыб как объекта исследования дублированных генов. Несмотря на компактность, литературный обзор охватывает практически все относящиеся к теме и все важнейшие источники, дает ясную и исчерпывающую картину современного состояния проблемы и свидетельствует о хорошей теоретической подготовке соискателя. След заметить, что отсутствует упоминание об основных моделях эволюции дублированных генов, которые включают т.н. концертную эволюцию и очищающий отбор.

Раздел «Материал и методы» включает подробное изложение использованных экспериментальных подходов и свидетельствует о высоком методическом уровне предлагаемой работы. Автором освоены важнейшие методы молекулярной генетики – ПЦР, рестриктазный анализ, электрофорез, клонирование, автоматизированное секвенирование, а также широкий набор методик работы с последовательностями,

статистический анализ полученных данных, включая различные методы филогенетических реконструкций. Автор широко пользовалась современными компьютерными программами обработки данных. В этом разделе замечание вызывает отсутствие информации об использовании референсных последовательностей, на основании которых подбирались сайты рестрикции и праймеры для первоначальной амплификации генов гормона роста и относительно которых затем выравнивались полученные фрагменты. По всей видимости, в ходе выполнения исследования автором была разработана панель праймеров для получения полноразмерной последовательности генов гормона роста у видов *Salvelinus*, что само по себе может быть отнесено к одним из результатов работы.

В разделе Результаты представлен целый ряд интересных и новых результатов. В обсуждении показана новизна и научно-практическая значимость полученных результатов.

Так, по результатам секвенирования дублированных генов гормона роста у четырех дальневосточных видов рода *Salvelinus* получено представление о их длине, количестве основных структурных элементов, определены кодирующие области и получены их аминокислотные последовательности. Сделан вывод о том, что варьирование длины генов происходит за счет некодирующих участков. Показаны различия в нуклеотидном и аминокислотном составе между паралогами (внутри видов) и ортологами (между видами) у представителей семейства лососевых рыб, которые позволяют сделать вывод о различных скоростях эволюции. Полученные автором результаты позволяют подтвердить на основании более полных данных, что лососевые имеют два несцепленных функциональных гена гормона роста.

Анализ кодирующих последовательностей генов гормона роста у видов *Salvelinus* и других лососевых рыб, а также сравнение скоростей синонимичных и неснонимичных замен показал, что основным эволюционным фактором, определяющим высокую консервативность этих участков, является отрицательный (очищающий) отбор. Интересные результаты получены при сравнительном анализе интронных и экзонных участков генов-паралогов у лососевых рыб. Несмотря на более высокие темпы мутаций в интронах в сравнении с экзонами, они тем не менее все же остаются небольшими и согласуются с показателями изменчивости в экзонах. Автор приходит к выводу, что интронные участки также могут находиться под давлением очищающего отбора, что связано как с наличием разнообразных регуляторных элементов, идентифицированных в

предыдущих работах у различных представителей Salmonidae, или же с эффектами хитч-хайкинга и Хилла-Робертсона.

Построенные на основе последовательностей экзонов и интронов в отдельности филогенетические деревья свидетельствуют о давней дупликации и независимой дивергенции генов-паралогов, случившейся намного раньше, чем возникли предковые формы ныне живущих видов лососевых. Автором были выявлены различия в топологии деревьев и положении отдельных таксонов. Отсутствие конгруэнтности филогенетических связей в семействе по различным участкам генов-паралогов позволяют автору сделать вывод о различных темпах эволюции и неодинаковой силе очищающего отбора; очевидно, что подобные функциональные гены, даже некодирующие их области, дают смещенную оценку дивергенции таксонов и, следовательно, мало пригодны для филогенетических реконструкций.

Результаты, полученные диссертантом, могут быть использованы в развитии исследований эволюции генома и филогении лососевых рыб, выполняемых в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), в Зоологическом Институте РАН, Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), на кафедре ихтиологии биофака МГУ им. М.В. Ломоносова, а также в курсах лекций для студентов, специализирующихся в ихтиологии и популяционной генетике. Они имеют практическое значение для создания аквакультурных трансгенных линий и могут найти свое применение в соответствующих учреждениях РАН и РАСХН, ФГУП Всероссийский научно-исследовательский Институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) и его дальневосточных отделений (ТИНРО, СахНИРО), Росрыбвода, Миннауки и Минсельхоза.

Принципиальных замечаний к основным разделам диссертации не имеется. Отмеченные выше отдельные недостатки не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы. Диссертация находится на уровне передовых работ в этой области и не уступает аналогичным зарубежным исследованиям как в отношении постановки проблемы, связанной с исследованием структуры и эволюции дублированных генов у лососевых рыб, так и в способах ее решения, базирующихся на использовании самых современных методов молекулярной генетики и филогении. Все сделанные диссертантом выводы соответствуют поставленным целям. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ в отечественных изданиях. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Заключение.

Диссертационная работа "Структура и эволюция генов гормона роста лососевых рыб (Salmonidae)" соответствует основным квалификационным критериям (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Панькова Марина Владимировна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Отзыв подготовлен старшим научным сотрудником лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН к.б.н. Н.В. Гордеевой, обсужден и утвержден на научном семинаре лаборатории популяционной генетики.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62
Почтовый адрес: 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3, www.vigg.ru

Старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики, кандидат биологических наук, e-mail: ribka04@mail.ru

Наталья Валерьевна Гордеева

Подпись Гордеевой Натальи Валерьевны удостоверяю

Заместитель директора Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, доктор биологических наук



Серикбай Каримович Абилов

Дата:

11.05.2016 г.