

ЯГОДИНА ВИКТОРИЯ ДМИТРИЕВНА

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ И ВРЕМЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНОЙ
И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА
APOSTICHORUS JAPONICUS ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Брыков Владимир Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Радченко Ольга Аркадьевна, доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, директор

Воронова Анастасия Николаевна, кандидат биологических наук, Тихоокеанский филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению ихтиопатогенов водных биологических ресурсов

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится 5 июля 2023 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

Факс: (423)2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/64-yagodina-viktoriya-dmitrievna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Вашенко

М.А. Вашенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Молекулярные исследования, основанные на генетических маркерах, помогают выяснить факторы, определяющие генетическую структуру морских организмов, что играет важную роль в понимании биологии популяции, масштабов естественного отбора и принятия решений о рациональной эксплуатации видов (Selkoe, Toonen, 2011; Soliman et al., 2012). Воспроизведение многих прибрежных гидробионтов включает планктонные фазы распространения, называемые пропгулами. Они часто выбрасываются в открытое море и переносятся течениями в подходящую среду обитания, где развиваются во взрослых особей (Levin, 2006). Рассредоточение личинок представляет собой важный механизм расселения морских видов, особенно тех, взрослые особи которых ведут оседлый образ жизни или проявляют ограниченную подвижность в фазе половозрелости (Fratini et al., 2013).

Морские огурцы (Holothuroidea) характеризуются наружным оплодотворением и плавающей личинкой и представляют собой морфологически разнообразную, экологически важную и экономически ценную группу иглокожих (Echinodermata). В их число входит дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867). Вид распространен в прибрежных водах северо-восточной Азии, где является одним из важнейших объектов аквакультуры благодаря своей пищевой ценности и широкому использованию в медицине. Однако с расширением масштабов искусственного воспроизводства и резким сокращением природных ресурсов за последние три десятилетия запасы диких популяций *A. japonicus* уменьшаются. В связи с сокращением численности вида, как правило, уменьшается его генетическое разнообразие, что может приводить к снижению выживаемости, увеличению смертности в результате инбридинга. В настоящее время ведутся исследования по изучению *A. japonicus* как промыслового объекта и восстановлению его численности, в том числе при помощи искусственного выращивания в условиях мариккультуры (Yan et al., 2013). Однако для рационального природопользования видов (изъятия и воспроизводства) необходимо установление их популяционно-генетической структуры (Janes et al., 2017). С этой целью для получения полной картины изменчивости генетического разнообразия и структуры популяции на значительной части ареала *A. japonicus* был проведен анализ как митохондриальной ДНК, так и микросателлитных локусов ядерной ДНК.

Степень разработанности темы. Генетическое разнообразие и популяционная структура промысловых голотурий (Valente et al., 2014; Soliman et al., 2016; Adachi et al., 2018; Namamoto et al., 2021) исследовались на основе анализа последовательности фрагмента гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы митохондриальной ДНК (*COI* мтДНК), с помощью

микросателлитных маркеров (Chen et al., 2008; Kim et al., 2008; Kanno et al., 2006; Chang et al., 2009; Kang et al., 2011; Soliman et al., 2012; An et al., 2013) и однонуклеотидных полиморфизмов (Du et al., 2012; Dong et al., 2016).

На Дальнем Востоке России научные работы посвящены изучению биологии *A. japonicus*, его образа жизни, процессов, связанных со снижением численности (Селин, 2001; Лысенко и др., 2015; Подкорытов, Масленников, 2015; Лысенко и др., 2018), а также выращиванию дальневосточного трепанга в искусственных условиях (Гаврилова, Кучерявенко, 2010; Мокрецова и др., 2012; Гаврилова, 2013; Гаврилова, Кондратьева, 2018). Исследований по установлению популяционной структуры и оценке уровней генетического разнообразия *A. japonicus* на Дальнем Востоке России не проводилось.

Цель и задачи исследования. Основная цель исследования заключалась в оценке генетической изменчивости и выяснения вероятной популяционно-генетической структуры *A. japonicus* в заливе Петра Великого Японского моря.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать изменчивость мтДНК в выборках *Apostichopus japonicus* в заливе Петра Великого Японского моря и оценить уровень различий между ними.
2. Установить наиболее вероятные факторы, влияющие на изменчивость мтДНК и структуру гаплотипической сети.
3. Оценить уровень гетерогенности исследуемых выборок *A. japonicus* на основе изменчивости десяти микросателлитных локусов ядерной ДНК.
4. Провести коррекцию данных десяти микросателлитных локусов ядерной ДНК исследуемых выборок *A. japonicus* с учетом нулевых аллелей.
5. Предложить вероятные факторы, влияющие на распределение генетической изменчивости десяти микросателлитных локусов ядерной ДНК *A. japonicus* в исследуемом ареале.
6. Сравнить результаты применения двух типов независимо наследуемых молекулярных маркеров при изучении популяционно-генетической структуры *A. japonicus*.
7. Выявить особенности генетической изменчивости *A. japonicus* в исследуемом ареале, которые могут быть обусловлены негативным антропогенным воздействием.

Научная новизна. В работе впервые получены данные по генетическому разнообразию и популяционной структуре *A. japonicus* для Дальнего Востока России на протяженном участке его ареала. В результате исследования изменчивости мтДНК *A. japonicus* обнаружена генеалогическая подразделенность гаплотипов. По итогам работы с микросателлитными локусами ядерной ДНК выявлена гетерогенность выборок дальневосточного трепанга, а также доказано, что нуль-аллели влияют на интерпретацию

результатов, и дальнейшее применение полученных данных возможно только после их корректировки. Показано, что использование двух типов маркеров позволяет получить более полную картину популяционно-генетической структуры *A. japonicus*.

Теоретическое и практическое значение работы. Изучение генетической изменчивости *A. japonicus* дает возможность охарактеризовать генетическое своеобразие и уникальность популяций вида, выработать рекомендации для рационального промысла и культивирования, а также, в перспективе выявить генетические маркеры, ассоциированные с выживаемостью, скоростью роста и другими признаками.

Методология и методы исследования. Амплификацию фрагмента гена *COI* мтДНК осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), получение первичных нуклеотидных последовательностей проводилось по методу Сэнгера, сборка последовательностей выполнена в программе Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au>). Дальнейший анализ изменчивости мтДНК проведен в программах MEGA 11 (Tamura et al., 2021), DnaSP 6.12.03 (Rozas et al., 2017), Arlequin 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010), ProSeq3 (Filatov, 2009) и Network 10.2.0.0 (<http://fluxus-engineering.com>).

Микросателлитные локусы амплифицировали с помощью ПЦР. Длину фрагментов в полученных ПЦР продуктах визуализировали с применением программы GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, США). Обнаружение ошибок генотипирования выполнено в программе MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al., 2004). Анализ изменчивости в микросателлитных локусах осуществлен в стандартных программах (GenePop 4.7.0, Rousset, 2008; GenAIEx 6.5.1, Peakall, Smouse, 2012; Fstat 2.9.3, Goudet, 1995; Arlequin 3.5, Excoffier, Lischer, 2010). Популяционная структура была оценена с помощью различных подходов в стандартных программах (STRUCTURE, Pritchard et al., 2000; FreeNa, Chapius, Estoup, 2007; StructureSelector, Li, Liu, 2018). Тестирование прохождения выборок *A. japonicus* через “горлышко бутылки” проведено в программе BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al., 1999).

Личный вклад автора. Автором была выполнена экспериментальная часть работы в полном объеме, самостоятельно освоены все программы для анализа данных. Автор также принимал непосредственное участие в написании научных публикаций и представлении результатов работы на конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменчивость мтДНК *Apostichopus japonicus* структурирована генеалогически, что объясняется разбросом в репродуктивном успехе.
2. Статистически значимые различия между выборками *Apostichopus japonicus* по микросателлитным локусам ядерной ДНК выявляют различия практически между всеми выборками, несмотря на коррекцию результатов по нулевым аллелям.

3. Тестирование микросателлитных локусов ядерной ДНК выявило прохождение «горлышка бутылки» генеральной совокупностью особей *Apostichopus japonicus* в заливе Петра Великого Японского моря, что подтверждается низкой изменчивостью мтДНК.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием двух типов независимо наследуемых молекулярных маркеров, а также применением стандартных молекулярно-генетических подходов для интерпретации результатов. Проводилось сравнение полученных данных с ранее опубликованными исследованиями и базами данных. В подтверждении результатов приведены таблицы и рисунки.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на региональных, всероссийских и международных научных конференциях. По материалу диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в отечественных и международных журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура работы. Основной текст диссертации изложен на 162 страницах, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Дополнительно представлено шесть приложений, изложенных на 10 страницах. Работа содержит 32 таблицы и 26 рисунков. Список литературы насчитывает 341 наименование, 316 из которых на английском языке.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю В.А. Брыкову за предложение поработать над столь интересной темой и грамотное руководство. Искренне благодарна Е.И. Бондарь за помощь на начальных этапах анализа микросателлитных локусов. Выражаю глубокую признательность А.Г. Олейник за ценные советы, которые позволили улучшить работу, а также за неоценимую поддержку при написании диссертации. Благодарю Е.С. Балакирева за важные замечания и интерес к работе. Хотелось бы отметить помощь Н.М. Батищевой, А.А. Семенченко, А.Д. Кухлевского, К.В. Ефимовой и С.Н. Шариной при возникновении вопросов, касающихся экспериментальной части. Отдельно выражаю признательность К.А. Винникову за возможность проведения большей части экспериментальной работы в Лаборатории экологии и эволюционной биологии водных организмов ИМО ДВФУ, а также О.Г. Шевченко за возможность работы в Центре коллективного пользования «Приморский океанариум». Благодарю своих первых студенческих научных руководителей В.В. Мордуховича и Д.М. Атопкина за помощь и поддержку в первых шагах в науку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. В работе было исследовано пять выборок дальневосточного трепанга *A. japonicus* (рис. 1), собранных водолазным способом из разных локальностей зал. Петра Великого Японского моря: зал. Восток (Vos, 2015 г.), м. Красный, Амурский зал. (Krs, 2015 г.), зал. Посьета (Pos15, 2015 г.), б. Федорова, Амурский зал. (Fed, 2015 г.), зал. Посьета (Pos18, 2018 г.). Всего было изучено 159 особей дальневосточного трепанга по микросателлитным локусам яДНК и 117 по фрагменту гена *COI* мтДНК.

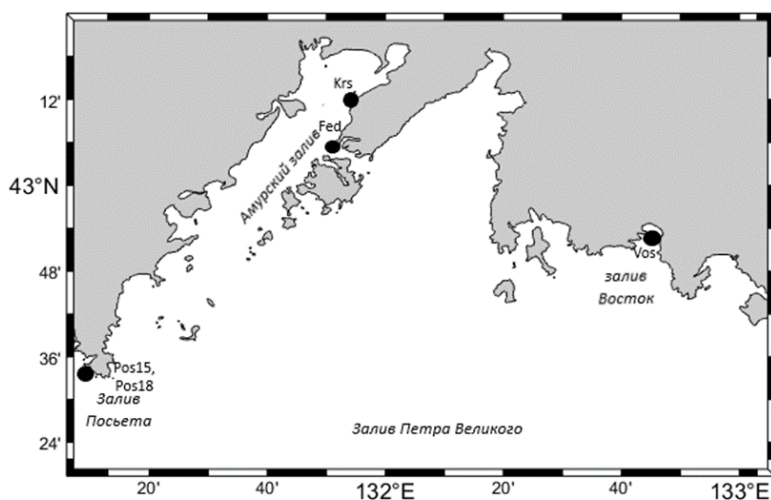


Рисунок 1. Географическое положение исследованных выборок *Apostichopus japonicus* (Ягодина и др., 2022).

Аmplification мтДНК и секвенирование. Фрагмент гена *COI* мтДНК амплифицировали с использованием праймеров COI_{ce}-F и COI_{ce}-R (Hoareau, Boissin, 2010). Секвенальная реакция проведена с применением набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США). Секвенирование выполнено в генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) на базе Кафедры клеточной биологии и генетики ИМО ДВФУ.

Статистическая обработка данных мтДНК. Сборка последовательностей проведена в программе Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au>), выравнивание осуществлено в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021) с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004). Итоговая длина последовательности составила 554 п.н. Показатели молекулярного разнообразия рассчитывали в программе DnaSP 6.12.03 (Rozas et al., 2017). Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA; Excoffier et al., 1992), тесты нейтральности F_s (Fu, 1997) и D (Tajima, 1989a), расчет индексов неоднородности Харпендинга (r ; Harpending, 1994) и

суммы квадратов отклонений (*SSD*; Schneider, Excoffier, 1999) для выборок *A. japonicus* выполнены в программе Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, Lischer 2010); вероятность критериев (*P*) оценена при 10000 случайных перестановок. Коалесцентное моделирование для значений нуклеотидной изменчивости проведено в программе ProSeq3 (Filatov, 2009). Тестирование уровня дифференциации с использованием критерия χ^2 , а также определение потока генов (*Nm*, Hudson et al., 1992) между выборками осуществлено в программе DnaSP 6.12.03. Дифференциация между выборками оценена при помощи показателя F_{st} (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) в программе Arlequin 3.5.1.2. Деревья для эвристического поиска были построены в MEGA 11 с применением метода объединения соседей (NJ; Saitou, Nei, 1987) на основе K2p-расстояний, а также метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA; Sokal, Michener, 1958) на основе *p*-расстояний. Устойчивость топологии дерева оценивали с помощью бутстрэп-анализа (Felsenstein, 1985) – 1000 повторов. Дополнительно были построены медианные сети гаплотипов (MJ; Bandelt et al., 1999) с визуализацией в программе Network 10.2.0.0 (<http://fluxus-engineering.com>). Анализ распределения частот попарных нуклеотидных различий (*mismatch*-распределений) проведен в соответствии с рекомендациями (Schneider, Excoffier, 1999) для каждой выборки, суммарно по ареалу и для выделенных гаплогрупп в программе Arlequin 3.5.1.2.

Аmplификация микросателлитных локусов яДНК и определение длины фрагментов полученных ПЦР-продуктов. В полимеразной цепной реакции использовали следующие праймеры: AJ20333, AJ10675, AJ13361 (Chen et al., 2013); PS205, 3S16 (Peng et al., 2012); Psj1828, Psj2889, Psj2409, Psj2464 (Kanno et al., 2005); FCS9 (Shangguan, Li, 2018). К 5' концу каждого прямого праймера лигирован хвост M13, помеченный одним из флуоресцентных красителей («Синтол», Россия). Проведение ПЦР осуществлялось в лаборатории «Экология и эволюционная биология водных организмов» ИМО ДВФУ, а также на базе ЦКП «Приморский океанариум». Смесь из ПЦР продуктов добавляли в раствор для генотипирования и затем подвергали электрофорезу в генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) на базе кафедры Клеточной биологии и генетики ИМО ДВФУ. Длину фрагментов в полученных ПЦР продуктах визуализировали в программе GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, США).

Статистическая обработка данных микросателлитных локусов яДНК. Обнаружение ошибок генотипирования осуществлено в программе MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al., 2004). Для проверки нейтральности микросателлитных локусов были проведены тесты в программном пакете Popgene 1.31 (Yeh et al., 1997) и в программе BayeScan 2.1 (Foll, Gaggiotti, 2008). Показатели генетического разнообразия были определены в программах GenAIEx 6.5.1 (Peakall, Smouse, 2012), Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995),

Arlequin 3.5.1.2, Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). Тест на соответствие ожиданиям Харди-Вайнберга (P) с использованием метода цепей Маркова и проверка на неравновесие по сцеплению для всех пар локусов были выполнены в программе GenePop 4.7.0 (Rousset, 2008). Расчет F_{st} (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) проведен в программе FreeNA (Chapius, Estoup, 2007) с помощью метода коррекции ENA. Оценка потока генов была косвенно определена в программе GenAIEx 6.5.1. Стандартные генетические дистанции Нея (D_s ; Nei, 1972) были подсчитаны в GenAIEx 6.5.1; на основе D_s была построена UPGMA дендрограмма в программе Populations 1.2.32 (Langella, 1999). Также в программе Populations 1.2.32 рассчитаны хорд-дистанции Кавалли-Сфорца и Эдвардса (D_{CE} ; Nei, Kumar, 2000), на базе которых в программе PHYLIP 3.698 (Felsenstein, 1989; Felsenstein, 2005) построены NJ-деревья. Определение генетической структуры *Apostichopus japonicus* проводилось в программе STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000) с использованием параметров по умолчанию и с расширенными настройками в соответствии с рекомендациями (Wang, 2017; Janes et al., 2017). Суммарные гистограммы для каждого K визуализированы в программе CLUMPAK (Kopelman et al., 2015). Оптимальное число генетических групп определяли показателем ΔK по методу Эванно (Evanno et al., 2005), а также с помощью метода, применяемого в программе STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Для сравнения результатов была применена статистика с использованием максимумов и медиан средних (Puechmaille, 2016). Тестирование прохождения выборок *A. japonicus* через “горлышко бутылки” проведено в программе BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al., 1999) с применением теста знаков и двустороннего теста Уилкоксона по мутационным моделям IAM (модель бесконечных аллелей), TPM (двухступенчатая модель; дисперсия - 12, доля множественных мутаций 5%; Piry et al., 1999) и SMM (модель пошаговой мутации). Дополнительно проведен тест сдвига моды (Luikart et al., 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ изменчивости мтДНК в выборках *Apostichopus japonicus*. При изучении изменчивости фрагмента гена *COI* мтДНК было обнаружено 16 гаплотипов для всех выборок дальневосточного трепанга. Последовательности были депонированы в GenBank (номера OR077239-OR077254). Среднее для всех выборок гаплотипическое разнообразие составило 0.86767 ± 0.01800 , нуклеотидное разнообразие - 0.00759 ± 0.00025 (табл. 1).

Для определения взаимоотношений гаплотипов мтДНК изучаемых выборок дальневосточного трепанга были получены деревья, построенные на основе p -дистанций (UPGMA-дерево, рис. 2А) и K_2p -дистанций (NJ-дерево, рис. 2Б). В результате формировалось 2 кластера, положение гаплотипов на фенограммах не менялось за

исключением гаплотипов H4 и H13. При исследовании взаимоотношений между гаплотипами изучаемых выборок *A. japonicus* была построена генеалогическая сеть гаплотипов с помощью MJ-метода (рис. 3). MJ-сеть имеет небольшую генеалогическую глубину, поскольку расстояния между гаплотипами (с учетом медианных векторов) не превышают трех нуклеотидных замен. Алгоритм программы реконструировал 3 медианных вектора, понижающих долю гомоплазий и, с определенной долей вероятности, представляющих гаплотипы, отсутствующие в анализе.

Таблица 1. Молекулярное разнообразие выборок *Apostichopus japonicus* зал. Петра Великого на основе последовательности фрагмента гена *COI* мтДНК

Выборка	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>S</i>	$k \pm SD$	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$
Vos	29	11	17	4.16749±2.13323	0.86946± 0.04300	0.00752±0.00054
Krs	20	6	13	3.91053±2.04637	0.78421±0.06400	0.00706±0.00061
Pos15	25	9	17	4.57333±2.32447	0.88000± 0.03900	0.00826± 0.00057
Fed	21	7	12	3.83810± 2.00950	0.78571± 0.07400	0.00693±0.00054
Pos18	22	11	18	4.42857±2.27070	0.90043± 0.04100	0.00799± 0.00098
Общее	117	16	21	4.20336±0.31863	0.86767±0.01800	0.00759±0.00025

Примечание. *N* – размер выборки, *n* – число гаплотипов, *S* – число полиморфных сайтов, *k* – среднее число нуклеотидных различий, *h* – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие, SD – стандартное отклонение.

Изучение частотных распределений попарных различий между последовательностями продемонстрировало мультимодальность для отдельных выборок (рис. 6). На основе сети гаплотипов и фенограмм особи *A. japonicus* были сгруппированы в 2 гаплогруппы по двум вариантам с учетом расположения гаплотипов H4 и H13 на деревьях. Результаты иерархического анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) продемонстрировали: (1) статистически незначимый индекс фиксации ($F_{ST} = 0.00070$, $P > 0.05$) для изучаемых выборок; (2) общую тенденцию распределения изменчивости: процент изменчивости между двумя гаплогруппами выше, чем внутри них (табл. 2). Индексы фиксации F_{ST} в обоих случаях были значимы ($P < 0.001$). Величина потока генов для варианта 1 составила 0.17, для варианта 2 – 0.23. Анализ распределения числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*; рис. 5) выявил мультимодальность, как и при подсчете для отдельных выборок.

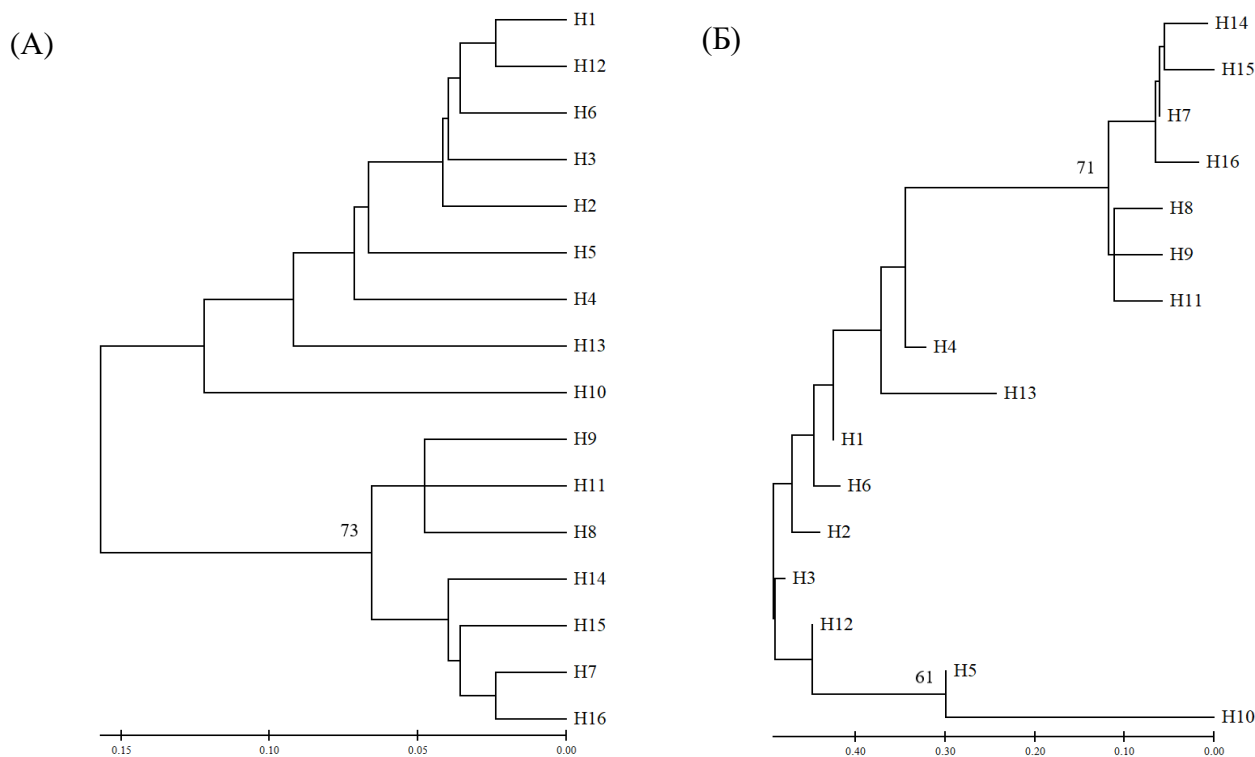


Рисунок 2. Фенетические отношения гаплотипов *Apostichopus japonicus* по данным фрагмента гена *COI* мтДНК. Оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 псевдореplik) приведены только для тех точек ветвления, которые воспроизводятся более чем в 50% деревьев. А – **UPGMA** - дерево, построенное на основе *p*-расстояний для гаплотипов *A. japonicus*. Б – **NJ** - дерево, построенное на основе *K2p*-расстояний для гаплотипов *A. japonicus*.

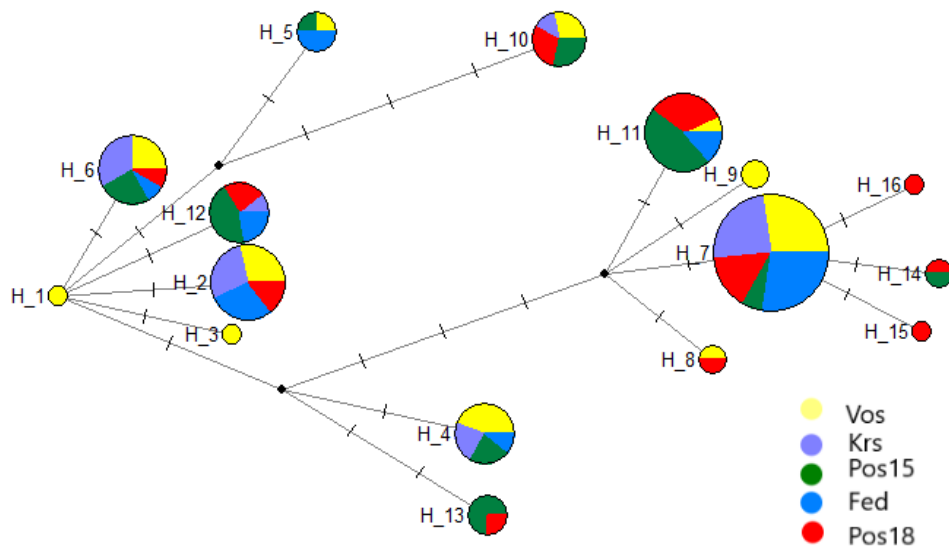


Рисунок 3. Генеалогическая сеть (MJ - анализ) гаплотипов мтДНК *Apostichopus japonicus* исследуемых выборок. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален абсолютным частотам гаплотипов. Все мутации имеют равный вес, интервал поиска медианных векторов ϵ равен нулю (Ягодина, Брыков, 2023).

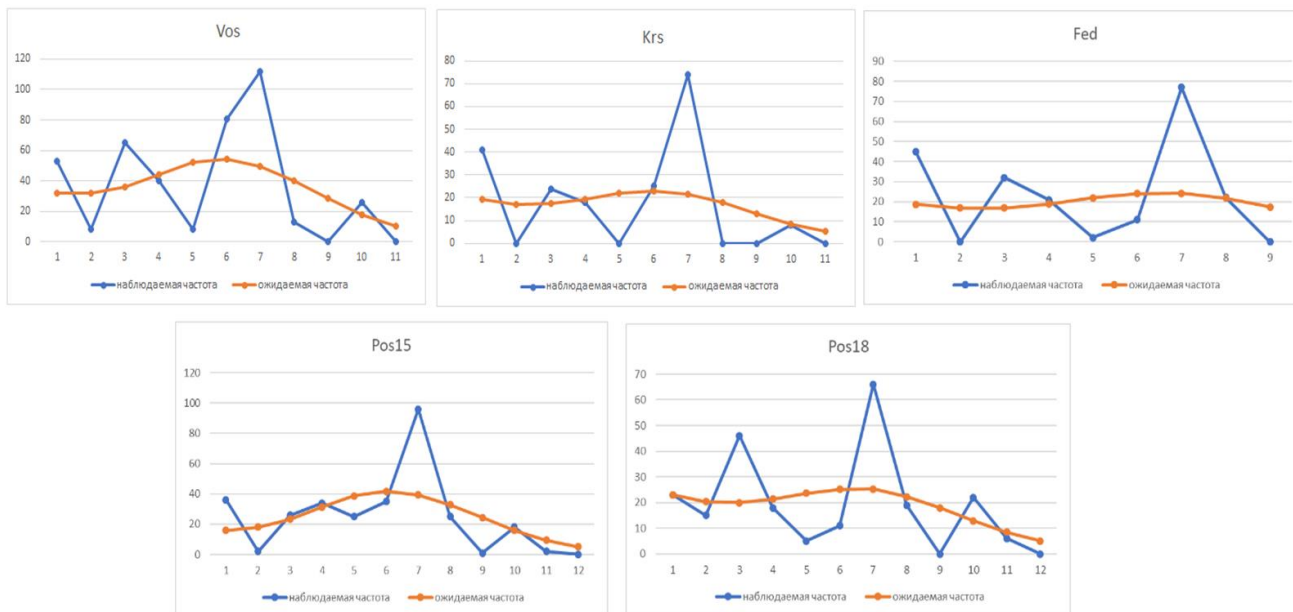


Рисунок 4. Распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Apostichopus japonicus* для каждой выборки. Ось x показывает количество парных различий, ось y показывает частоту парных сравнений (Ягодина, Брыков, 2023).

Таблица 2. Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) по частотам гаплотипов мтДНК в выборках и в гаплогруппах *Apostichopus japonicus* по 2 вариантам группировки гаплотипов

Уровень разнообразия	d.f.	Сумма квадратов	Компоненты дисперсии	Процент дисперсии	Индекс	Вероятность (P)
Вариант 1: Между гаплогрупп Внутри гаплогрупп	1	103.054	1.79863	59.51	0.59509	0.00000***
	115	140.741	1.22383	40.49		
Вариант 2: Между гаплогрупп Внутри гаплогрупп	1	126.706	2.15244	67.89	0.67887	0.00000***
	115	117.089	1.01817	32.11		

Примечание. d.f. – число степеней свободы, ***P<0.001.

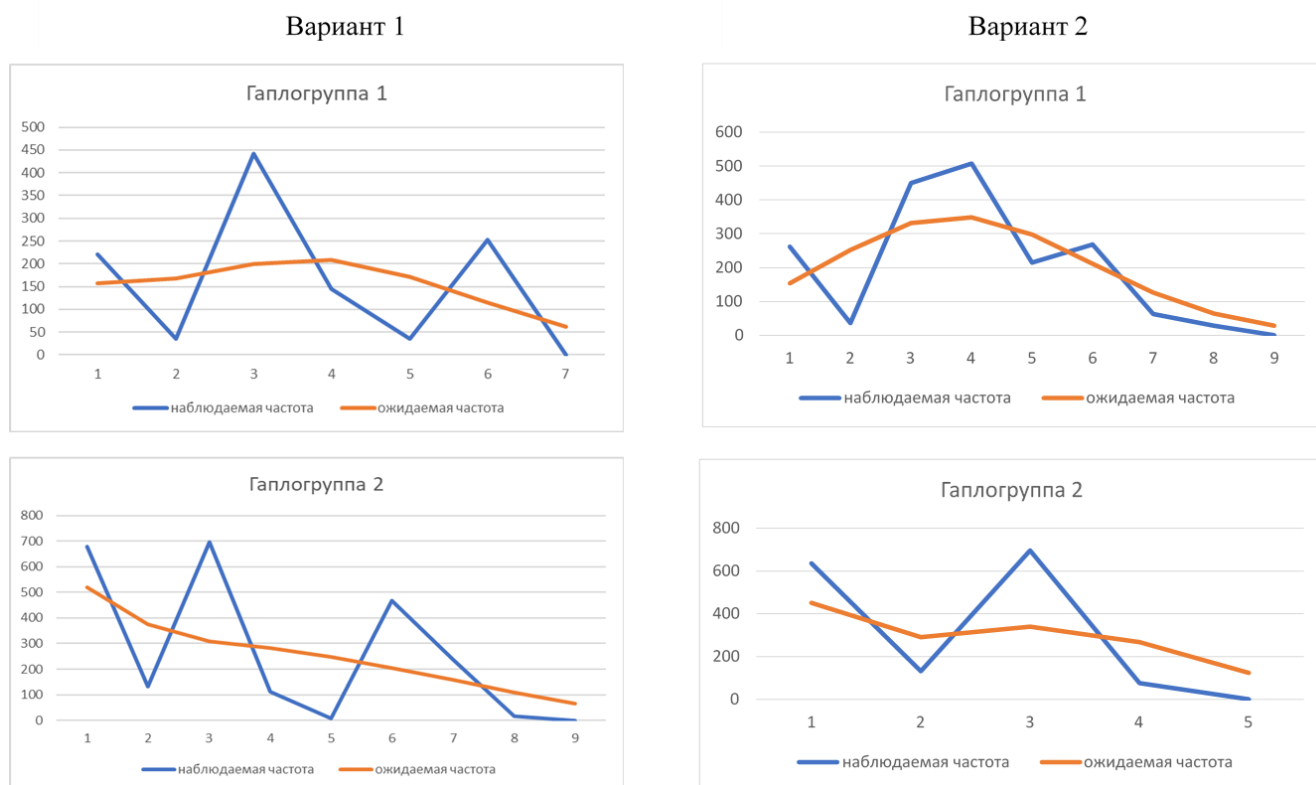


Рисунок 5. Распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Apostichopus japonicus* внутри гаплогрупп. Ось x показывает количество парных различий, ось y показывает частоту парных сравнений.

Изучение генетического разнообразия и дифференциации выборок *Apostichopus japonicus* по микросателлитным локусам яДНК с исправлением ошибок генотипирования. В результате изучения генетического разнообразия *Apostichopus japonicus* было обнаружено 108 аллелей по 10 микросателлитным локусам. Результаты тестов на нейтральность для всех локусов по всем выборкам представлены в таблице 3. Для теста Эванса-Ваттерсона значение наблюдаемой гомозиготности находилось за пределом доверительного интервала только в локусе AJ10675. С использованием теста на нейтральность в программе BayeScan четыре микросателлитных локуса демонстрировали возможное отклонение от нейтральности ($q < 0.05$): AJ10675, PS205, Psj2889, Psj2409.

Нулевые аллели были обнаружены в четырех локусах из десяти: в локусе AJ20333 (зал. Восток, б. Федорова), AJ13361 (зал. Посьета_2018), Psj1828 (м. Красный, зал. Посьета_2018) и 3S16 (зал. Восток). В программе MICRO-CHECKER ошибки генотипирования были скорректированы и далее приведены данные с учетом коррекции. Показатели генетического разнообразия для выборок *A. japonicus* по локусам, для которых определены нулевые аллели, представлены в таблице 4.

Таблица 3. Тесты на нейтральность десяти микросателлитных локусов *Apostichopus japonicus*

Локус	Тест Эванса-Ваттерсона				Тест, выполненный в программе BayeScan (Байесовские вычисления)		
	Obs. F	SE	L95	U95	F_{ST}	α	q
AJ20333	0.2959	0.0112	0.1453	0.5666	0.083	-0.002	0.472
AJ10675	0.2821	0.0329	0.2844	0.9160	0.342	1.781	0.000***
AJ13361	0.4040	0.0295	0.2450	0.8822	0.110	0.259	0.166
PS205	0.3036	0.0115	0.1488	0.5560	0.022	-1.504	0.001***
Psj1828	0.2422	0.0082	0.1324	0.4996	0.044	-0.786	0.058
Psj2889	0.1646	0.0134	0.1637	0.6018	0.013	-2.065	0.000***
Psj2409	0.2740	0.0087	0.1340	0.4950	0.023	-1.447	0.004**
Psj2464	0.2497	0.0114	0.1517	0.5602	0.083	-0.009	0.350
FCS9	0.2438	0.0176	0.1907	0.6954	0.083	-0.004	0.418
3S16	0.1551	0.0118	0.1507	0.5688	0.077	-0.097	0.264

Примечание. Obs. F – наблюдаемая гомозиготность, SE – стандартная ошибка, L95 – нижняя граница доверительного интервала 95%, U95 – верхняя граница доверительного интервала 95%, F_{st} – коэффициент F_{st} , усредненный по выборкам; α – альфа-коэффициент, указывающий на силу и направление отбора; q – значение отклонения от модели нейтральности, **q<0.01, ***q<0.001.

Для всех скорректированных данных было отмечено увеличение индекса разнообразия Шеннона, уменьшение разницы между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью, а также уменьшение коэффициента инбридинга (табл. 4). Средние значения показателей по всем выборкам изменились незначительно. Все выборки по скорректированным данным также отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга ($P < 0.05$).

При изучении фенетических отношений между выборками *A. japonicus* наблюдалось формирование высокоподдержанных кластеров (рис. 6А, 6Б). На основе данных кластеризации с помощью метода Эванно (рис. 7А) были определены показатели ΔK , которые для стандартных и расширенных настроек были одинаковы. Наибольшее среднее значение логарифмического правдоподобия апостериорных вероятностей (рис. 7Б) отличалось при разных типах настроек. Байесовская кластеризация (STRUCTURE, рис. 8) с использованием шести нейтральных локусов (табл. 3) по расширенным настройкам подтвердила наиболее вероятную подразделенность выборок (кластеризацию при полном наборе локусов, рис. 9).

Тестирование прохождения выборок через “горлышко бутылки” на основе смещения распределения частот аллелей микросателлитных локусов (табл. 5) не выявило значимых

смещений показателей моды. Для генеральной совокупности выборок отклонение от равновесия мутации-дрейфа зарегистрировано при использовании теста Уилкоксона для всех мутационных моделей.

Таблица 4. Сравнение оценок генетического разнообразия пяти выборок *Apostichopus japonicus* по десяти микросателлитным локусам для данных с корректировкой по нулевым аллелям и без нее

Выборка	Локус	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{is}</i>	P
Vos	AJ20333	1.476	0.333	0.721	0.540	0.000***
	AJ20333	1.562	0.480	0.743	0.359	0.000***
	3S16	1.961	0.400	0.844	0.529	0.000***
	3S16	2.035	0.640	0.866	0.265	0.000***
	Среднее по всем локусам	1.575±0.111	0.528±0.058	0.729±0.035	0.286±0.068	
	Среднее по всем локусам	1.591±0.114	0.567±0.052	0.733±0.036	0.242±0.056	
Krs	Psj1828	1.806	0.350	0.819	0.579	0.000***
	Psj1828	1.982	0.538	0.883	0.400	0.000***
	Среднее по всем локусам	1.323±0.108	0.503±0.044	0.668±0.037	0.241±0.061	
	Среднее по всем локусам	1.341±0.118	0.522±0.040	0.675±0.040	0.223±0.052	
Fed	AJ20333	1.596	0.370	0.734	0.500	0.001***
	AJ20333	1.774	0.500	0.805	0.385	0.001***
	Среднее по всем локусам	1.534±0.116	0.525±0.044	0.732±0.037	0.271±0.074	
	Среднее по всем локусам	1.552±0.118	0.538±0.041	0.739±0.037	0.259±0.071	
Pos18	AJ13361	0.972	0.200	0.585	0.663	0.000***
	AJ13361	1.086	0.333	0.637	0.485	0.004**
	Psj1828	1.570	0.308	0.704	0.568	0.000***
	Psj1828	1.740	0.471	0.779	0.403	0.010**
	Среднее по всем локусам	1.405±0.122	0.478±0.122	0.684±0.039	0.299±0.070	
	Среднее по всем локусам	1.433±0.122	0.508±0.035	0.697±0.039	0.265±0.055	
Среднее для всех выборок		1.434±0.070	0.505±0.022	0.693±0.018	0.273±0.045	
Среднее для всех выборок		1.673±0.190	0.525±0.038	0.699±0.034	0.251±0.041	

Примечание. *I* – индекс разнообразия Шеннона, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность, *F_{is}* – коэффициент инбридинга, P – значение отклонения от равновесия Харди-Вайнберга; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; серым цветом обозначены данные, скорректированные по нулевым аллелям.

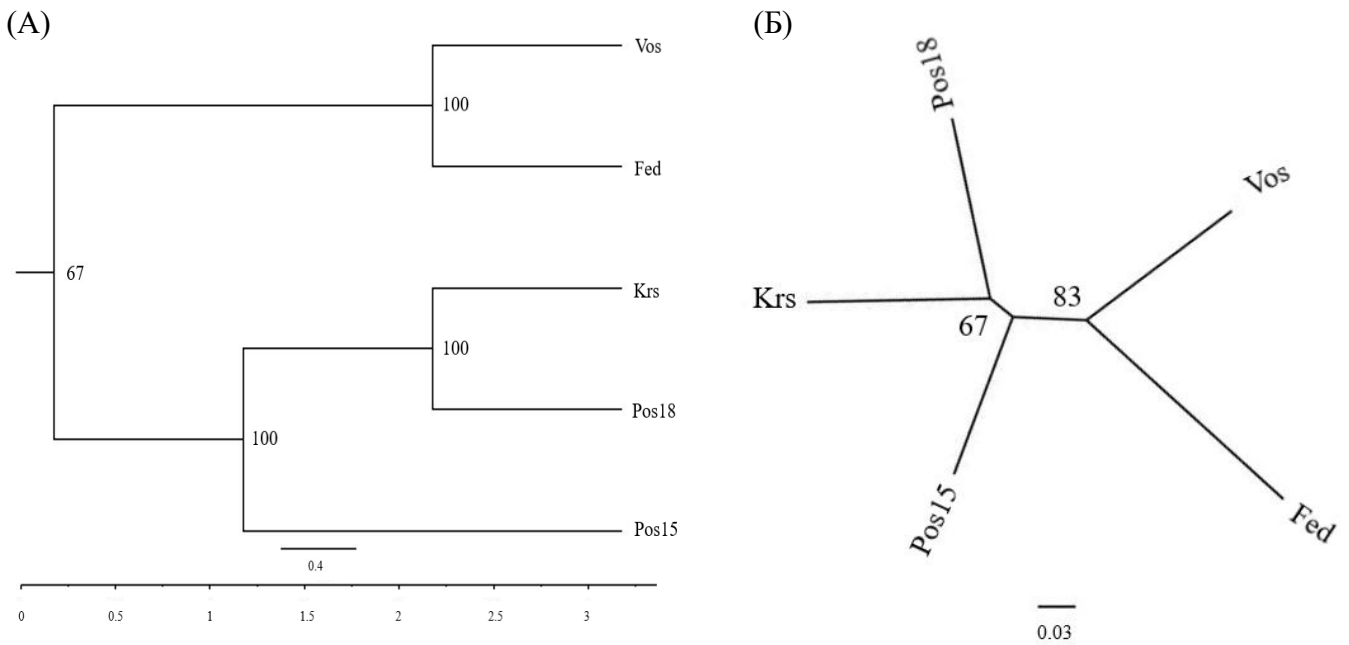


Рисунок 6. Фенетические отношения выборок *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов яДНК. А – **UPGMA** - дерево, построенное с использованием стандартных дистанций Нея (Yagodina et al., 2022). Б – **NJ** - дерево, построенное на основе хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса.

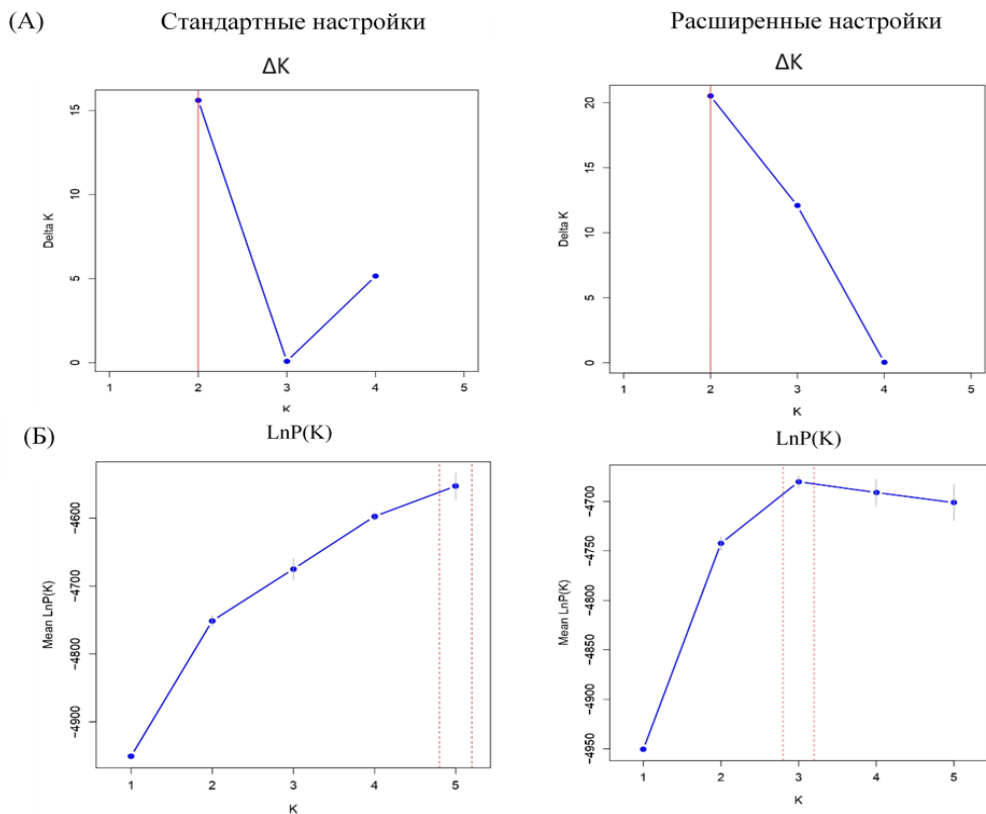


Рисунок 7. Определение оптимального числа кластеров для выборок *Apostichopus japonicus* с использованием стандартных и расширенных настроек. А - определение ΔK для различного количества кластеров (графики сверху), Б - логарифмическое правдоподобие апостериорных вероятностей для определения наиболее вероятного числа кластеров (графики снизу).

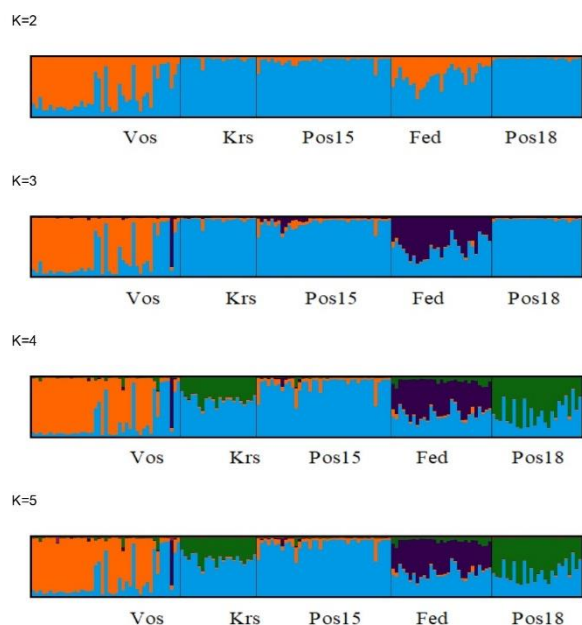


Рисунок 8. Гистограммы, построенные на основе 20 прогонов для каждого K для шести нейтральных микросателлитных локусов по результатам программы STRUCTURE с расширенными настройками по скорректированным данным. По горизонтали указаны выборки *Apostichopus japonicus*.

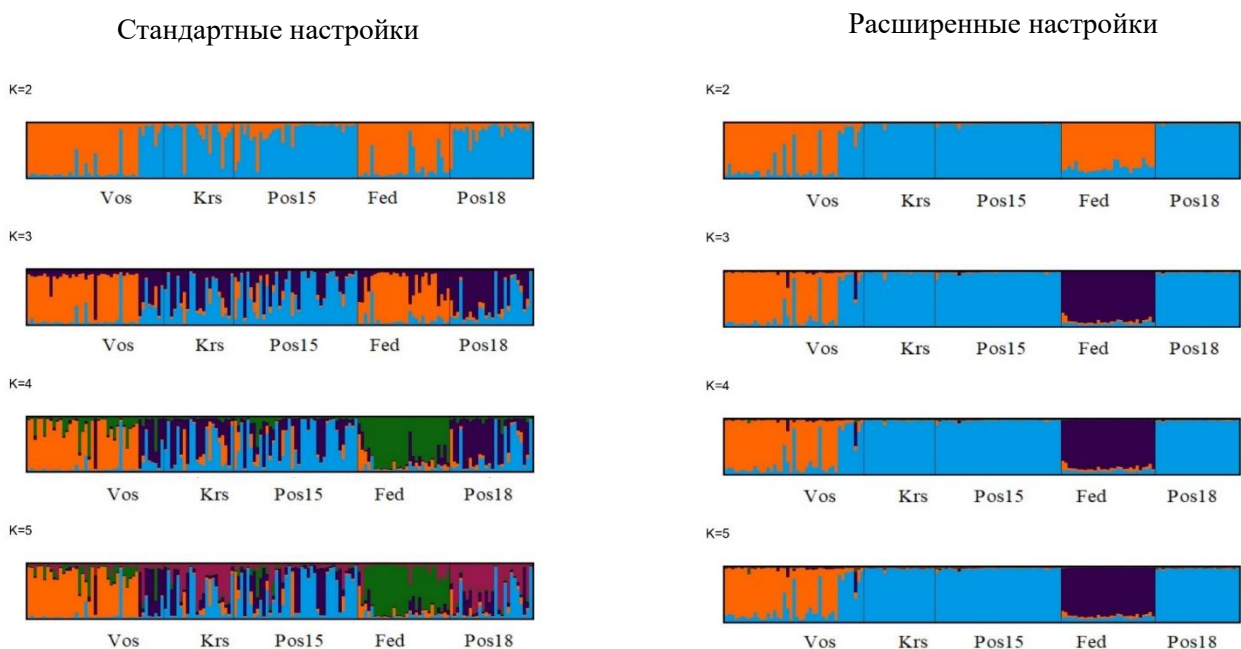


Рисунок 9. Гистограммы, построенные на основе 20 прогонов для каждого K по результатам программы STRUCTURE со стандартными и расширенными настройками. По горизонтали указаны выборки *Apostichopus japonicus*.

Таблица 5. Результаты тестирования прохождения выборками *Apostichopus japonicus* “горлышка бутылки” в программе BOTTLENECK

Выборка	Тест, мутационная модель, вероятность						
	Знаков			Уилкоксона (двусторонний)			Сдвиг моды
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	
Vos	0.15199	0.06655	0.06942	0.10547	0.13086	0.03223*	нет
Krs	0.34200	0.38479	0.18764	0.27539	0.32227	0.23242	нет
Pos15	0.13978	0.00192**	0.00174**	0.01367**	0.00977***	0.00684**	нет
Fed	0.00409**	0.19974	0.01739*	0.00098***	0.32227	0.10547	нет
Pos18	0.61224	0.06513	0.01491*	0.08398	0.10547	0.02441*	нет
Общее	0.37468	0.06279	0.00233**	0.02441*	0.01855**	0.00488**	нет

Примечание. *P<0.05, **P<0.01.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость мтДНК *Apostichopus japonicus* залива Петра Великого. Полученные результаты анализа изменчивости фрагмента гена *COI* мтДНК свидетельствуют о низком генетическом разнообразии *A. japonicus* в исследуемом ареале. Среди потенциально существенных причин снижения генетического разнообразия можно рассматривать высокую антропогенную нагрузку (развитая городская береговая линия; Nehemia, Kochzius, 2017; Soliman et al., 2016), а также незаконный промысел. Проведенное исследование частично подтверждает эти наблюдения, так как выборки м. Красный и б. Федорова были собраны в местах с хорошо развитыми береговыми линиями.

Кластеризация гаплотипов мтДНК на основе стандартных генетических дистанций позволила выделить две группировки, не связанные с географической локализацией выборок. На основании кластерного анализа гаплотипы объединялись в две группы по двум вариантам. Полученные при проведении иерархического анализа молекулярной дисперсии результаты свидетельствуют о дифференциации генеалогических групп. Следовательно, существуют барьеры для переноса личинок. Можно назвать несколько причин. Во-первых, различия в истории расселения, генетическом составе новых особей и отборе в период плавающей личинки после оседания — все это факторы, которые могут вызывать генетическую неоднородность (Hedgecock, Pudovkin, 2011; Watts et al., 1990). Во-вторых, во всех районах расселение молоди дальневосточного трепанга неравномерно, и зависит от гидрологического режима, типа грунта, наличия полей анфельции или зарослей zostеры (Левин, 2000). В-третьих, однонаправленный ток личинок вероятен вследствие их расселения посредством течений. В-четвертых, вероятная причина - наличие в прошлой истории вида

двух популяций с ограниченным генетическим обменом. В-пятых, на гаплотипическую структуру могли повлиять большие различия в репродуктивном успехе (Hedgcock, 1982). Такие отличия возникают из-за случайных процессов согласования репродуктивной активности с океанографическими условиями, способствующими созреванию гамет, оплодотворению, личиночному развитию, расселению и пополнению взрослой популяции. Об этом свидетельствуют неглубокие генеалогии и низкие уровни молекулярно-генетического разнообразия (Hedgcock, Pudovkin, 2011), характерные для *A. japonicus* в исследуемой акватории.

Влияние нулевых аллелей на анализ генетической изменчивости и дифференциации микросателлитных локусов яДНК. В популяционных исследованиях нулевым аллелем называют отсутствие продукта ПЦР в связи с рядом причин: деградацией ДНК, ее низкой концентрацией, а также мутацией в последовательностях ДНК, фланкирующих микросателлит (Dakin, Avise, 2004). Все это приводит к появлению ложных гомозигот, которые влияют на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга и ведут к некорректной интерпретации результатов (Carlsson, 2008).

В проведенном исследовании нулевые аллели были выявлены, а также была сделана попытка сравнить полученные значения без корректировки и с ней. Нулевые аллели были зарегистрированы не во всех локусах и не во всех исследованных выборках дальневосточного трепанга. Из 10 микросателлитных локусов 4 показали наличие нулевых аллелей в разных выборках. Присутствие нулевых аллелей приводило к большим расхождениям между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью, а также к высоким показателям коэффициента инбридинга. При расчете средних значений рассматриваемые величины не сильно менялись, что, скорее всего, связано с небольшим количеством нулевых аллелей и небольшим объемом выборок. При увеличении объема выборки и/или числа локусов частота нуль-аллелей способна также измениться в сторону своего повышения для каждой выборки и локуса, что могло бы привести к более сильному отклонению статистических показателей.

На сегодняшний день проблема нулевых аллелей решается разными способами: изменением дизайна праймеров (Wu et al., 2019), корректировкой частот аллелей и генотипов на основе предполагаемых частот нулевых аллелей (Chapius, Estoup, 2007), выбором наиболее подходящих статистических методов и программ для определения нуль-аллелей (Campagne et al., 2012; Chybicki, Burczyk, 2009; Ягодина и др., 2022). Иногда определенные локусы исключаются из популяционного анализа (Wagner et al., 2006). Однако последний метод коррекции не всегда применим при масштабных исследованиях, так как при увеличении выборок возрастает вероятность появления нулевых аллелей на каждый локус,

что может привести к исключению большого числа локусов из популяционного анализа и отрицательно сказаться на качестве исследования.

Генетическое разнообразие *Apostichopus japonicus* зал. Петра Великого по данным микросателлитных локусов яДНК. Значения наблюдаемой гетерозиготности практически в каждом локусе для каждой группы особей были меньше ожидаемой. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было обнаружено для каждого локуса. В целом можно говорить о небольшом дефиците гетерозигот для популяций дальневосточного трепанга Японского моря (Kim et al., 2008; Chang et al., 2009; An et al., 2013). Выявленный дефицит гетерозигот может быть вызван несколькими причинами: (1) большим разбросом в репродуктивном успехе (Hedgcock, Pudovkin, 2011), так как соответствие размножения океанографическим условиям, способствующим оплодотворению, росту, развитию и расселению личинок, скорее всего, является случайным процессом, в котором вероятность репродуктивного успеха не зависит от генотипа; (2) инбридингом, возможно, обусловленным антропогенными факторами, так как незаконный (браконьерский) лов дальневосточного трепанга значительным образом сказался на естественных популяциях (Лысенко и др., 2018).

Популяционно-генетическая структура *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК. Данные по анализу микросателлитных локусов дальневосточного трепанга из 4 локаций залива Петра Великого выявили генетическую дифференциацию между выборками. Биология вида *A. japonicus* не предполагает присутствие генетически независимых внутривидовых единиц в исследуемой акватории вследствие высокой вероятности потока генов практически во всех направлениях. Можно назвать несколько факторов, обуславливающих обнаруженную гетерогенность. Во-первых, наличие пелагической личинки в жизненном цикле дальневосточного трепанга, способной переноситься из одной локальности в другую посредством течений. Во-вторых, занесение личинок из одних местообитаний *A. japonicus* в другие возможно с балластными водами, поскольку во всех локальностях расположены морские порты. В-третьих, фактором может быть отличающееся давление отбора по локусам количественных признаков и сцепленными с ними микросателлитами. Однако надежное обнаружение отбора остается сложной задачей (Li et al., 2010). Результаты, полученные с помощью двух методов определения нейтральности микросателлитов, не полностью согласованы, возможно, из-за разницы в статистической мощности с использованием нескольких показателей изменчивости. Чтобы получить четкие доказательства отбора этих маркеров, необходимы дальнейшие исследования. В-четвертых, так как при исключении локусов-кандидатов, отклоняющихся от гипотезы нейтральности, гетерогенность все равно была выявлена, она может определяться

разбросом в репродуктивном успехе, при котором в определенной локальности оседают личинки, происходящие от немногих особей-производителей (Hedgcock, Pudovkin, 2011).

Демографическая история *Apostichopus japonicus* в исследуемом ареале по данным мтДНК и микросателлитных локусов яДНК. Анализ *mismatch*-распределений для индивидуальных выборок и гаплогрупп продемонстрировал мультимодальность. Основные пики наблюдаемых частот приходятся на 6-7 нуклеотидных замен для каждой выборки. Такие нуклеотидные замены также присутствуют на графиках для гаплогрупп. Следовательно, *A. japonicus* в изучаемом ареале сохраняет гаплотипы с высоким уровнем различий. Генетические тесты «горлышка бутылки» требуют предположений о мутационной модели микросателлитов для получения ожидаемых распределений статистики (Cornuet, Luikart, 1996; Garza, Williamson, 2001). Для микросателлитных маркеров обычно применяется двухфазная модель мутаций (TPM), которая состоит из двух параметров: дисперсии и доли многоэтапных изменений (Peery et al., 2012). Ранговый тест Уилкоксона обеспечивает относительно высокую силу по сравнению с тестом знаков (Cornuet, Luikart, 1996), и только выборка зал. Посьета_2015 отклонялась от нулевой гипотезы (равновесие мутации-дрейфа) с применением TPM. Однако при рассмотрении совокупности выборок с использованием теста Уилкоксона значимые ($P < 0.05$) отклонения обнаружены по всем мутационным моделям. Таким образом, прохождение особями *A. japonicus* «бутылочного горлышка» на исследуемой территории, случившееся в недавнем прошлом, обнаружено по исследуемым микросателлитным локусам.

Сравнение митохондриальных и микросателлитных маркеров при изучении дифференциации между выборками *Apostichopus japonicus*. При изучении генетической изменчивости и популяционной структуры *A. japonicus* зал. Петра Великого были использованы разные типы молекулярных маркеров. Если по результатам использования микросателлитов мы определяем наличие гетерогенности выборок дальневосточного трепанга, то использование фрагмента гена *COI* мтДНК демонстрирует низкий уровень дифференциации между выборками, но выявляет генеалогическую подразделенность гаплотипов. Многие исследования также показали противоречивые данные по популяционной структуре у одного и того же вида при исследовании ядерной ДНК и митохондриальной ДНК (Patton et al., 1997; Baric et al., 2005; Brito, 2007; Toews, Brelsford, 2012).

Эмпирические (Eble et al., 2011) и теоретические (Larsson et al., 2009) исследования демонстрируют, что либо мтДНК, либо микросателлиты могут обнаруживать дивергенцию популяции, не проявляющуюся в другом классе маркеров. Результаты для бентосных морских организмов здесь информативны, поскольку расселение осуществляется почти

исключительно за счет личинок, тогда как молодь и взрослые особи редко перемещаются более чем на 1 км в течение жизни (Karl et al., 2012).

Область молекулярной экологии изобилует упрощенными утверждениями, что один класс маркеров более чувствителен к структуре популяции, чем другой класс. Это заблуждение наиболее ярко проявляется в заявлениях о том, что мтДНК проявит популяционную дивергенцию сначала в недавно разделенных популяциях из-за более высокого уровня генетического дрейфа, или что микросателлиты проявят дивергенцию в первую очередь из-за высокой скорости мутаций и гетерозиготности. И то, и другое может быть верным в отдельных обстоятельствах, в зависимости от сложного набора условий, включающих генетическое разнообразие, генетически эффективный размер популяции, скорость мутаций и миграции, а также рассредоточение по половому признаку (Karl et al., 2012). Очевидно, что ни один класс маркеров не является априори более чувствительным (т. е. лучше способным обнаруживать популяционную дифференциацию и структуру) во всех условиях. Поэтому делать однозначные заявления о преимуществе одного генетического маркера над другим сомнительно (Schlötterer, 2004). Но объединение двух разных типов маркеров может быть полезным для получения более полной оценки генетической структуры популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным дифференциация выборок *A. japonicus* с использованием фрагмента гена *COI* мтДНК, соответствующая современному популяционному делению, не была обнаружена. Однако выявлена генеалогическая подразделенность гаплотипов. Оценка потока генов между гаплогруппами показала очень низкие значения, связанные, вероятно, с генетическим пулом новых особей и разбросом в репродуктивном успехе (Watts et al., 1990; Hedgecock, Pudovkin, 2011)

Изучение генетического разнообразия *A. japonicus* с использованием десяти микросателлитных локусов продемонстрировало небольшой дефицит гетерозигот для популяций дальневосточного трепанга Японского моря, что может быть вызвано несколькими причинами: возможным разбросом в репродуктивном успехе, а также инбридингом. Явление инбридинга, возможно, обусловлено антропогенными факторами, так как незаконный (браконьерский) лов дальневосточного трепанга значительным образом сказался на естественных популяциях. На территории Приморья ведется наблюдение за изменением численности *A. japonicus*. В частности, оценка состояния его популяции проводилась в Дальневосточном морском заповеднике (Лысенко и др., 2015; Лысенко и др., 2018). Было показано, что численность *A. japonicus* после браконьерского промысла

стабилизировалась и дальневосточный трепанг не находится под угрозой исчезновения. Однако средняя плотность поселений этой голотурии примерно в 20 раз ниже плотности, при которой был начат незаконный ее вылов (Лысенко и др., 2018).

Результаты по изучению генетической дифференциации между выборками дальневосточного трепанга с помощью микросателлитных локусов выявили высокий уровень гетерогенности, что может быть вызвано стохастическими процессами при оседании личинок в определенной локальности. Личинки могут приходить из разных исходных популяций в разное время, в зависимости от направления течений (Kordos, Burton, 1993). Свободно нерестящиеся морские беспозвоночные могут производить миллионы гамет. Шансы на то, что любая из них будет оплодотворена и выживет при пелагическом расселении, очень малы. Это сочетание высокой репродуктивной способности и высокого уровня смертности на ранних стадиях жизни означает, что только несколько взрослых особей могут быть ответственны за большую часть пополнения в течение любого конкретного сезона. Такой разброс репродуктивного успеха может ограничивать разнообразие молодежи (Hedgcock, 1986; Hedgcock, Pudovkin, 2011) и уменьшать наблюдаемый генетически эффективный размер популяции (Palumbi, Wilson, 1990).

Статистические тесты для микросателлитных локусов выявили прохождение генеральной совокупностью особей *A. japonicus* «горлышка бутылки», что согласуется с показателями низкой изменчивости по данным мтДНК. Для дальнейших исследований демографической истории необходимо увеличение числа особей в выборках и числа выборок дальневосточного трепанга, насколько это применимо для вида, находящегося под угрозой исчезновения (Hamel, Mercier, 2013).

Использование различных типов молекулярных маркеров позволяет всесторонне изучить популяции вида, выявить факторы, которые оказывают влияние на генетическое разнообразие и популяционно-генетическую структуру. Возможно, применение дополнительных маркеров позволит подтвердить полученные в данной работе результаты, так как генетическое изучение *A. japonicus* на всей протяженности его ареала – одна из важнейших задач для сохранения этого вида.

ВЫВОДЫ

1. Анализ изменчивости фрагмента гена *COI* мтДНК выявил генеалогическую подразделенность гаплотипов *Apostichopus japonicus* в зал. Петра Великого Японского моря, что может быть связано с разбросом в репродуктивном успехе.
2. Низкий уровень генетического разнообразия мтДНК может быть обусловлен снижением численности дальневосточного трепанга в изучаемой акватории.
3. Генетическая гетерогенность выборок *A. japonicus* по десяти микросателлитным локусам яДНК, вероятно, обусловлена разбросом в репродуктивном успехе.
4. Проведенная коррекция данных микросателлитных локусов яДНК *A. japonicus* с учетом нулевых аллелей оказала влияние на некоторые показатели генетического разнообразия (наблюдаемую гетерозиготность, коэффициент инбридинга) и генетической дифференциации (устойчивость топологии дендрограмм), а также подтвердила высокий уровень гетерогенности выборок.
5. Анализ изменчивости по десяти микросателлитным локусам яДНК *Apostichopus japonicus* выявил дефицит гетерозигот, что может быть вызвано несколькими причинами: вероятным разбросом в репродуктивном успехе и инбридингом.
6. Комплексное применение двух типов маркеров позволяет получить более полную картину популяционно-генетической структуры *A. japonicus*.
7. Полученные результаты низкой генетической изменчивости по данным мтДНК и микросателлитным локусам яДНК *A. japonicus* в исследуемой акватории могут быть связаны с антропогенными факторами – браконьерским ловом и загрязнением прибрежной зоны.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Yagodina V.D.**, Bondar E.I., Brykov V.A. Genetic variability and population structure of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, 1867 revealed by microsatellites in Peter the Great Gulf, Sea of Japan // Marine Biodiversity. 2022. Vol. 52. Article no. 40. Doi: 10.1007/s12526-022-01278-0.
2. **Ягодина В.Д.**, Батищева Н.М., Брыков В.А. Изменчивость ядерных локусов у дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) в выборках из залива Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2022. Т. 48, № 5. С. 328–337.
3. **Ягодина В.Д.**, Брыков В.А. Генетическое разнообразие мтДНК дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2023. Т. 49, № 1. С. 45–55.

Работы в материалах конференций:

1. **Iagodina V.D.**, Batishcheva N.M., Polyakova N.E., Brykov V.A. Using of microsatellite loci in invertebrates and fishes for population studies and parentage analysis // 2020 AKSTS Young generation science conference, Moscow, July 1–5, 2020. – Novosibirsk: NSTU Publisher, 2020. P. 107–108.
2. **Ягодина В.Д.**, Батищева Н.М., Брыков В.А. Влияние нулевых аллелей на генетическое разнообразие и популяционную структуру *Apostichopus japonicus* Selenka, 1867 // IX Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям», Москва, 15–19 марта 2021 г. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39. С. 56. (Спецвыпуск). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://school.img.ras.ru/?p=materialy>.
3. **Iagodina V.D.**, Brykov V.A. Identification of population structure of Japanese sea cucumbers, *Apostichopus japonicus*, from Peter the Great Bay, Sea of Japan, using microsatellite loci // Abstracts of the International Conference Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook, October 6–8, 2021, Vladivostok, Russia. – Vladivostok: NSCMB FEB RAS, 2021. P. 80–81.
4. **Ягодина В.Д.**, Бондарь Е.И. Выявление хичхайкинга в естественных популяциях дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* залива Петра Великого Японского моря // «Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов»: тезисы докладов Всероссийской конференции (памяти академика Олега Григорьевича Кусакина), 20–23 сентября 2022 г., Владивосток, Россия. – Владивосток: ННЦМБ ДВО РАН, 2022.. С. 342–343.
5. **Ягодина В.Д.**, Брыков В.А. Популяционно-генетическая структура дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) залива Петра Великого (Японское море) по данным микросателлитных локусов // Современные проблемы биологической эволюции: материалы IV Международной конференции к 875-летию Москвы и 115-летию со дня основания Государственного Дарвиновского музея. 17–20 октября 2022, г. Москва. – М.: ГДМ, 2022. – С. 94.
6. **Yagodina V.D.**, Bondar E.I. Study of the population structure of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* in Peter the Great Bay (Sea of Japan/Eastern Sea) using microsatellite and mitochondrial markers // The 8th International Conference on Water Resource and Environment (WRE 2022) November 1–4, 2022, Xi'an, China. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://2022.wreconf.org/>. P. 9.

ЯГОДИНА ВИКТОРИЯ ДМИТРИЕВНА

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ И ВРЕМЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНОЙ
И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА
APOSTICHORUS JAPONICUS ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук