

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Ягодиной Виктории Дмитриевны

«Пространственная и временная изменчивость ядерной и митохондриальной ДНК дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* залива Петра Великого (Японское море)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика»

Актуальность темы исследования. В диссертации изучается генетическое разнообразие чрезвычайно популярного в Приморье и прибрежных странах Северо-Восточной Азии промыслового вида голотурий — дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), который благодаря богатому набору биологически активных химических соединений в своём составе с давних времен известен в качестве деликатесной и лечебной пищи. Дальневосточному трепангу посвящено много отечественных работ, по большей части касающихся изучения биологии и экологии иглокожего, знания же о генетике трепанга весьма ограничены. Исследования по определению популяционной структуры и уровней генетического разнообразия *A. japonicus* на Дальнем Востоке России не проводились и приобретают особую актуальность в свете произошедших существенных изменений в численности и распределении дальневосточного трепанга в заливе Петра Великого. Интенсификация промысла и несоблюдение норм добычи, а начиная с начала 90-х годов прошлого столетия, массовый браконьерский вылов, в конечном счете, сказались на значительном сокращении популяций трепанга. В связи с сокращением численности вида, как правило, уменьшается его генетическое разнообразие, что может приводить к снижению жизнеспособности. Пространственно-временная неоднородность ареала трепанга способна вызывать генетическую и фенотипическую дифференциацию в различных масштабах. Молекулярные исследования, основанные на генетических маркерах, помогают выявить факторы, определяющие популяционную структуру организмов, зафиксировать изменения частоты аллелей при различных селективных и микроэволюционных процессах. Раскрытие механизмов, определяющих поток генов и наблюдаемое генетическое структурирование, имеет решающее значение для понимания биологии популяции и в конечном итоге может поспособствовать рациональной эксплуатации и сохранению ценного вида в пределах среды обитания.

Выносимые на защиту научные положения. Защищаемые положения должны быть четкими и не вызывать сомнений. Формулировка тезиса «Статистически значимые различия между выборками *Apostichopus japonicus* по микросателлитным локусам ядерной ДНК выявляют различия ...» не ясна.

Новизна научных результатов. В данной работе впервые исследуется генетическое разнообразие дальневосточного трепанга, собранного из нескольких бухт акватории залива Петра Великого, с использованием двух типов маркёров: ядерных микросателлитов и гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы. В результате исследования изменчивости мтДНК *A. japonicus* обнаружена генеалогическая подразделенность гаплотипов. По итогам работы с микросателлитными локусами ядерной ДНК доказано, что нуль-аллели влияют на интерпретацию результатов, выявлена гетерогенность выборок дальневосточного трепанга, получены свидетельства отклонения от нейтральности микросателлитов, а также

определены микросателлитные аллели, которые могут находиться в сцеплении с другими функциональными генетическими элементами, а как известно, карты сцепления на основе микросателлитных маркеров могут быть использованы для изучения геномного распределения аллелей по локусам, ассоциированным с выживаемостью, скоростью роста, адаптивными признаками, изменениям фенотипа (в том числе патологическими).

Обоснованность и достоверность научных результатов. Использование спектра генетических маркеров с различной эволюционной динамикой сделало возможным наиболее полно изучить структуру популяции дальневосточного трепанга в масштабах исследуемой выборки. Выводы автора подкреплены статистическими расчетами в соответствии с общепринятыми в биоинформатике подходами для анализа такого рода генетических данных и наглядно интерпретированы. Основные результаты работы опубликованы в виде трёх статей в журналах из списка, рекомендованного ВАК, и представлены на 6 научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка литературы, шести приложений. Работа изложена на 162 страницах, включая 32 таблицы и 26 рисунков. Список литературы содержит 341 источник. Диссертация содержит семь выводов, отвечающих поставленным задачам. Автореферат соответствует тексту рукописи диссертации.

Общая характеристика работы.

Обзор литературы состоит из четырёх небольших по размеру подглав. В первых трёх даётся объяснение предпочтению в выборе маркёров и их применимости для интерпретации полученных результатов. Стоит отметить способность автора критически мыслить, указав не только на сильные, но и на слабые стороны маркёров, особенно, что касается микросателлитов и корректировки нулевых аллелей. Существует множество публикаций, например, по микросателлитам морских рыб, неплохо было бы дополнить обзор литературы сведениями оттуда, вместо цитируемых по млекопитающим. В последней подглаве характеризуется сам объект исследования, но можно было бы больше акцентировать внимание на условиях его обитания, как совокупности важных экологических факторов, способных определять генетическую структурированность популяции. На распределение трепанга оказывает влияние комплекс условий: глубина, гидрологические характеристики, свойства грунта, наличие убежищ и др., что, кстати, подробно описано в работах отечественных ученых Левина В.С., Мокрецовой Н.Д., Гавриловой Г.С., Лысенко В.Н., Масленникова С.И. и др. из списка литературы автора. В целом обзор выполняет свою задачу, однако, текст плохо вычитан, коробят отдельные словосочетания, а иногда и целые предложения, заимствованные из англоязычной литературы (неудачное калькирование). Во многих местах нарушена логика изложения, грамматическая и лексико-семантическая структура, присутствует излишнее дробление на абзацы – всё это затрудняет восприятие и негативно сказывается на общем впечатлении о работе. **Обсуждение результатов** выглядит несколько сумбурно и многословно. Во избежание этого, главы 4.1 (Изменчивость мтДНК *Apostichopus japonicus* залива Петра Великого) и 4.4 (Популяционно-генетическая структура *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК) лучше было бы объединить, ведь рассматриваются практически одни и те же возможные экологические

причины (история расселения, гидрологический режим, температура, течения, репродуктивный успех), вызвавшие появление гаплогрупп и мелкомасштабную гетерогенность трепанга. В **Заключении** кандидатской диссертации хотелось бы видеть не только резюмирование уже сказанного ранее, а более глубокое осмысление результатов, рассуждения о том, как проведенное исследование может помочь в сохранении популяции трепанга в заливе Петра Великого, о жизнеспособности популяции, о том какие заливы и бухты испытывают больший антропогенный прессинг. Тем более в соответствии с заявленной седьмой задачей и выводом, которые, по моему мнению, так и остались не раскрытыми.

Замечания и вопросы по содержанию диссертации.

1. Автор заявляет, что данные по генетическому разнообразию и популяционной структуре получены для *A. japonicus* с **протяженного участка** его ареала. Однако это явно преувеличенная оценка, взято всего 4 точки на три залива. В действительности же ареал дальневосточного трепанга очень обширен. В России вид распространен по всему заливу Петра Великого (включая все расположенные на его акватории острова и тем более бухты Уссурийского залива) и к северо-востоку за мыс Поворотный (Преображение), у берегов островов Сахалин, Монерон, Кунашир, не говоря уже о прибрежной части Японских островов, Восточно-Китайском и Желтом море. Не знаю, какие трудности со сбором материала испытывал автор, для научных целей отлов даже редких видов, как правило, разрешается, в любом случае, оправдано было бы включение в анализ последовательностей гена *cox1* китайских и японских образцов трепанга из GenBank и/или полноценное обсуждение данных по гаплотипическому разнообразию в сравнительном контексте. Японскими коллегами (Adachi et al., 2018) были получены результаты по демографии трепанга, отличные от полученных в данной работе: разветвленная паутинообразная сеть, экспоненциальный рост, унимодальность. Особенно такое сравнение было бы интересно, учитывая тот факт, что наиболее типичная окраска трепангов из зал. Петра Великого сходна с окраской очень немногочисленных голотурий у побережья Японии (1–2% общего количества), которых рассматривают как форму, промежуточную между «красной» и «зеленой» (Kanno M, Suyama Y, Li Qi, et al. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants).
2. Определение потока генов по фрагменту гена *cox1* мтДНК выявило его отсутствие между некоторыми выборками *A. japonicus* (между зал. Восток и м. Красный, зал. Восток и б. Федорова, м. Красный и б. Федорова, б. Федорова и зал. Посыета_2018) при низком значении F_{st} , как автор может это прокомментировать?
3. Удивительно, что при исследовании пространственно-временной гетерогенности автором не была проведена проверка модели IBD (Isolation-by-distance) с использованием теста Мантеля и регрессионного анализа для определения уровня влияния стохастических процессов.
4. Интересны рассуждения о возможных причинах, вызвавших ограничение потока генов, возникновения гаплогрупп и структурированности в выборках трепанга, и из всех возможных автор останавливается на общем выборе «репродуктивного успеха», что,

по моему мнению, является больше совокупностью факторов, чем самостоятельной категориальной единицей. В разных бухтах на популяцию могут влиять разные факторы. Более того разные участки бухты отличаются по своим биотопическим условиям, типу побережья, подводным формам микрорельефа, уровню волнения. Всё это автором не учтено так же, как не учтён ряд важных фактов из биологии трепангов, что порождает дополнительные вопросы:

4.1. Трепанг встречается группами или «стадами». Иногда животные в таких группах рассредоточены, но чаще «стадо» имеет очень четкие границы. Члены «стада» совместно кормятся, перемещаются, занимают убежища и выходят из них. Поэтому возникает вопрос, как осуществляли отлов животных для генетических исследований, были ли они из одного «стада» или из разных? Например, исследования в бухте Киевка показали, что там расположены три территориально изолированные скопления трепанга (вблизи о. Второй, у мысов Суцкого и Островной).

4.2. Для залива Петра Великого характерна высокая гидродинамическая активность. В таких условиях животные находят укрытия от волнового воздействия в скалах, расщелинах и на рифах, где существуют изменения профиля дна и создаются условия для аккумуляции пищевого материала. Почему площади биотопов твердых грунтов в условиях открытого побережья не рассматривали как фактор, ограничивающий распределение и регулирующий численность поселений трепанга?

4.3. Пространственная дифференциация размерно-возрастных групп. Какого возраста животных исследовали? Если трепанг был в возрасте 6 лет и старше, то можно сделать вывод что личинки, в связи с особенностями гидрологического режима, не поступают в акваторию, а голотурии попадают туда в основном путем миграций. Автор считает, что трепанг не способен совершать миграции по дну больше чем на 1 км, но это мнение ошибочное. Было показано, что при поисковом поведении голотурии могут передвигаться со скоростью до 10–12 см/мин, что при условном движении по прямой составит около 52 км/год.

4.4 Согласно приведенному автором примеру из гидродинамики, течение Куроиси выносит личинок из южных локальностей в северные. Могут ли в таком случае северные субпопуляции потерять возможность к самовоспроизводству? Какие акватории считать «областями размножения и выселения»?

- 5.** Вселение молоди трепанга, полученной в заводских условиях, на участки природных скоплений отражается на их массовой структуре через 3–4 года. Располагает ли автор информацией, о выпуске искусственно выращенной молоди в исследуемые акватории, чтобы делать вывод об этом, как о возможной причине снижения гетерозиготности?
- 6.** В обсуждении автор приходит к умозаключению, что мультимодальность по гену *sox1* указывает на стабильно существующую популяцию, не подверженную сокращению или увеличению числа особей и при этом делается противоречащий вывод в конце работы, о низком уровне генетического разнообразия мтДНК, который может быть обусловлен снижением численности дальневосточного трепанга в изучаемой акватории. Действительно, плотность поселений трепанга в зал. Петра Великого (0.024 экз/м²) значительно ниже среднепопуляционной. Как же, по мнению автора, стабильная популяция согласуется с избытком гомозигот, небольшой генеалогической глубиной сетей, сокращением численности и инбридингом? Для достоверного

определения сокращения численности можно было бы построить контурные диаграммы (скайлайны).

7. Смущает и тот факт, что выборки собраны 8 лет назад и насколько полученные результаты актуальны на сегодняшний день остается большим вопросом.

Трепанг непростой для исследования объект с сильно выраженной возрастной, экологической и географической изменчивостью и как любой гидробионт, находящийся под действием огромного комплекса экологических факторов. Такого рода работа всегда будет порождать много вопросов, но, несмотря на вышеперечисленные недостатки и замечания, это законченное исследование с большой перспективой на будущее. Методический аппарат, использованный в процессе выполнения работы, является её сильной стороной. Автором положено начало исследованию генетической структуры популяции трепанга и отработана методология, которую можно использовать при увеличении количества данных и анализе трепанга с других частей его обширного ареала, а целеустремленность и заинтересованность соискателя практически гарантируют, что такая работа будет проделана и ценные для науки выводы обязательно будут сделаны.

Диссертационная работа «Пространственная и временная изменчивость ядерной и митохондриальной ДНК дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* залива Петра Великого (Японское море)» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции от 11 сентября 2021 года), а её автор, Ягодина В.Д., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика».

Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории по изучению ихтиопатогенов водных биологических ресурсов
Тихоокеанского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ТИНРО»)

690091, г. Владивосток, переулок Шевченко, дом 4, тел. +7 423 240-09-21
Адрес электронной почты: anastasiya.voronova@tinro-center.ru

5 июня 2023 г.



Воронова Анастасия Николаевна

Подпись
Ведущий



А. Я., заверен
[Redacted]
[Redacted] Я.И.