

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Ягодина Виктория Дмитриевна

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

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Брыков Владимир Алексеевич

Владивосток – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Молекулярные маркеры как инструменты для изучения генетического разнообразия видов.....	13
1.2 Митохондриальная ДНК как молекулярный маркер	14
1.3 Микросателлиты как молекулярные маркеры.....	18
1.4 Общее представление об объекте исследования	26
1.4.1 Систематика, биология и экология <i>Apostichopus japonicus</i>	26
1.4.2 Промысловое значение <i>Apostichopus japonicus</i>	29
1.4.3 Генетические исследования <i>Apostichopus japonicus</i>	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
2.1 Объект исследования – дальневосточный трепанг <i>Apostichopus japonicus</i> ...	33
2.2 Выделение ДНК	33
2.3 Анализ мтДНК <i>Apostichopus japonicus</i>	34
2.3.1 Амплификация мтДНК и секвенирование.....	34
2.3.2 Статистическая обработка данных мтДНК	35
2.4 Анализ микросателлитных локусов яДНК <i>Apostichopus japonicus</i>	37
2.4.1 Амплификация ДНК и определение длины фрагментов полученных ПЦР-продуктов.....	37
2.4.2 Статистическая обработка данных микросателлитных локусов яДНК	39
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	43
3.1 Анализ изменчивости мтДНК в выборках <i>Apostichopus japonicus</i>	43
3.2 Изучение генетического разнообразия и дифференциации выборок <i>Apostichopus japonicus</i> по микросателлитным локусам яДНК.....	58
3.3. Определение нулевых аллелей в микросателлитных локусах яДНК.....	74

3.3.1 Изучение генетического разнообразия и дифференциации выборок <i>Apostichopus japonicus</i> по микросателлитным локусам яДНК с исправлением ошибок генотипирования	76
3.3.2 Изучение частот аллелей в микросателлитных локусах яДНК.....	93
4. ОБСУЖДЕНИЕ	94
4.1 Изменчивость мтДНК <i>Apostichopus japonicus</i> залива Петра Великого	94
4.2 Влияние нулевых аллелей на анализ генетической изменчивости и дифференциации микросателлитных локусов яДНК.....	98
4.3 Генетическое разнообразие <i>Apostichopus japonicus</i> зал. Петра Великого по данным микросателлитных локусов яДНК.....	102
4.4 Популяционно-генетическая структура <i>Apostichopus japonicus</i> по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК	107
4.5 Демографическая история <i>Apostichopus japonicus</i> в исследуемом ареале... 114	
4.5.1 Демографическая история <i>Apostichopus japonicus</i> по данным мтДНК . 114	
4.5.2 Демографическая история <i>Apostichopus japonicus</i> по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК.....	115
4.6 Сравнение митохондриальных и микросателлитных маркеров при изучении дифференциации между выборками <i>Apostichopus japonicus</i>	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ I.....	163
ПРИЛОЖЕНИЕ II	164
ПРИЛОЖЕНИЕ III.....	165
ПРИЛОЖЕНИЕ IV	168
ПРИЛОЖЕНИЕ V.....	171
ПРИЛОЖЕНИЕ VI	172

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

яДНК – ядерная ДНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

COI - ген субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы митохондриальной ДНК

SSR - simple sequence repeats, простые повторяющиеся последовательности

IAM - infinite alleles model, модель бесконечных аллелей

SMM - stepwise mutation model, модель пошаговой мутации

TPM - two-phase model, двухступенчатая модель

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Молекулярные исследования, основанные на генетических маркерах, помогают выяснить факторы, определяющие генетическую структуру морских организмов. Генетическое структурирование в открытых океанических средах может быть связано как с особенностями биологических циклов гидробионтов, так и с целым рядом внешних факторов, в том числе фрагментацией среды обитания, океаническими течениями или историческими геоморфологическими событиями (Silva, Gardner, 2016). Раскрытие механизмов, определяющих поток генов, играет важную роль в понимании биологии популяции, масштабов естественного отбора и принятия решений о рациональной эксплуатации видов (Selkoe, Toonen, 2011; Soliman et al., 2012).

В последние годы в связи с сосредоточенностью ученых на вопросах изменения климата также рассматриваются его последствия для морской среды. Уже известно, что повышение температуры морской воды сокращает продолжительность личиночных периодов, что предсказуемо влияет на популяции, структуры сообществ и биоразнообразии (O'Connor et al., 2007). Воспроизводство многих прибрежных морских организмов включает планктонные фазы распространения, такие как гаметы, яйца, личинки или споры (обычно называемые пропагулами; Fairweather, 1991), продолжительность расселения которых чрезвычайно изменчива, от нескольких часов до лет. Пропагулы часто выбрасываются в открытое море и переносятся течениями в подходящую среду обитания, где они развиваются во взрослых особей (Levin, 2006). Хотя смертность из-за отсутствия пополнения высока, рассредоточение личинок представляет собой важный механизм расселения морских видов, особенно тех, взрослые особи которых либо ведут оседлый образ жизни, либо проявляют ограниченную подвижность в фазе половозрелости (Fratini et al., 2013).

В течение многих лет центральной экологической парадигмой была идея о том, что в морской среде практически отсутствуют географические барьеры для расселения (Ekman, 1953). Согласно этому мнению, степень расселения морских

видов была просто связана с интенсивностью течений и продолжительностью личиночных фаз. Как правило, чем больше времени личинки проводят в толще воды, тем дальше они имеют тенденцию рассеиваться. В последнее время, на основе новых данных филогеографических и популяционно-генетических исследований, начал происходить сдвиг парадигмы (Silva et al., 2009; Fratini et al., 2013), и существование барьеров для распространения личинок стало очевидным. Еще одна экологическая парадигма, подвергающаяся пересмотру, — это пассивный характер расселения личинок среди морских беспозвоночных — предположение, которое до недавнего времени преобладало в морской биологии (Stobutzki, 2001). Однако в настоящее время оно подвергается сомнению на основании исследований поведения личинок и приспособлений к контролю их расселения (Levin, 2006). Как следствие, распределение особей в субпопуляциях в настоящее время признано сложным процессом, на который воздействует ограничение миграции. К факторам, влияющим на поток генов, можно отнести температуру (Wares et al., 2001), поведение личинок (Burton, Feldman, 1982), процессы верности исходной популяции (Taylor, Helberg, 2003) и физические океанографические события (Arndt, Smith, 1998). Однако океанические течения могут иметь два противоположных эффекта на генетическую структуру популяций морских беспозвоночных. С одной стороны, течения ответственны за расселение планктонных личинок, действуя как коридоры генного обмена, но в то же время течения могут создавать физические барьеры для потока генов (Palumbi, 1994; Galarza et al., 2009).

Для некоторых видов с пелагическими личинками (Hedgecock, 1986, Watts et al., 1990; Moberg, Burton, 2000) взрослые популяции демонстрируют генетическую дифференциацию между географически близкими локальностями. Это явление обозначается хаотичной мозаичностью (Johnson, Black, 1982) - термин, используемый для описания ситуации, когда популяции значительно отличаются без видимой закономерности: отдаленные популяции часто не более дифференцированы, чем близкорасположенные.

Морские огурцы (Holothuroidea) характеризуются наружным оплодотворением и плавающей личинкой и представляют собой морфологически разнообразную, экологически важную и экономически ценную группу иглокожих (Echinodermata). Они распространены по всему Мировому океану, от мелководных прибрежных районов до морских глубин (Tyler et al., 1992). Голотурии обитают в придонной зоне, питаются водорослями, мелкими животными и органическими веществами. Они снижают органическую нагрузку на экосистемы, выделяя при этом неорганический азот и фосфор, играя важную роль в рециркуляции питательных веществ. Некоторые виды могут повышать щелочность воды и концентрацию растворенного неорганического углерода за счет процессов пищеварения и выделения аммиака (Simões et al., 2019).

Морские огурцы, обитающие в Японском море, не являются исключением. В их число входит *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 (Oh et al., 2017).

Apostichopus japonicus - значимый промысловый вид в Северо-Восточной Азии, имеющий самую долгую историю эксплуатации в этом регионе (Purcell et al., 2012). Однако с расширением масштабов искусственного воспроизводства в марикультуре и резким сокращением природных ресурсов за последние три десятилетия запасы диких популяций *A. japonicus* уменьшаются (Chen et al., 2008). 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 запасов *A. japonicus* как промыслового объекта и восстановлению его численности, в том числе при помощи искусственного выращивания в условиях марикультуры (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; Намamoto et al., 2021) исследовались на основе анализа последовательности 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).

С использованием микросателлитных маркеров был проведен анализ генетической структуры и разнообразия *A. japonicus* в заливе Тояма (Япония) (Soliman et al., 2012). Изучение данной голотурии из различных локальностей побережья Южной Кореи показало применимость выбранных авторами микросателлитных локусов для генетического анализа (Kim et al., 2008). При исследовании популяций *A. japonicus* в работе Канно с коллегами (Kanno et al., 2006) были определены нулевые аллели и проведена работа по их корректировке.

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 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 между исследованными выборками *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 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 осуществлена в программе Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au>). Дальнейший анализ изменчивости мтДНК проводился в программах MEGA 11 (Tamura et al., 2021), DnaSP 6.12.03 (Rozas et al., 2017), Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, Lischer, 2010) и Network 10.2.0.0 (<http://fluxus-engineering.com>).

Микросателлитные локусы амплифицировали с помощью ПЦР. Длину фрагментов в полученных ПЦР продуктах визуализировали с помощью программы GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, США). Анализ изменчивости в микросателлитных локусах проведен в стандартных программах (GenePop 4.7.0, Rousset, 2008; GenAlEx 6.5.1, Peakall, Smouse, 2012; Fstat 2.9.3, Goudet, 1995; Arlequin 3.5.2.1, 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).

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 молекулярных маркеров для оценки генетической изменчивости и популяционной структуры *A. japonicus*, а также применением стандартных молекулярно-генетических подходов. Проведено сравнение полученных показателей с ранее опубликованными исследованиями и базами данных. В подтверждение результатов приведены таблицы, рисунки и графики.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на конференции «AKSTS young generation science conference» (Moscow, 2020), IX Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика 21 века - от исследования геномов к генетическим технологиям» (Москва, 2021), Международной конференции "Морская биология в 21 веке: достижения и перспективы развития" (Владивосток, 2021), Всероссийской конференции "Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов" (памяти академика Олега Григорьевича Кусакина, Владивосток, 2022), IV Международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2022), The 8th International Conference on Water Resource and Environment (конференция в формате онлайн, 2022).

Публикации. По материалу диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в 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 Владимиру Алексеевичу Брыкову за предложение поработать над столь интересной темой и грамотное руководство. Искренне благодарна Евгении Игоревне Бондарь за помощь на начальных этапах анализа микросателлитных локусов. Выражаю глубокую признательность Алле Геннадьевне Олейник за ценные советы, которые позволили улучшить работу, а также за неоценимую поддержку при написании диссертации. Благодарю Евгения Станиславовича Балакирева за важные замечания и интерес к работе. Хотелось бы отметить помощь Натальи Михайловны Батищевой, Александра Анатольевича Семенченко, Андрея Даниловича Кухлевского, Ксении Владимировны Ефимовой и Светланы Николаевны Шариной при возникновении вопросов, касающихся экспериментальной части. Отдельно выражаю признательность Кириллу Андреевичу Винникову за возможность проведения большей части экспериментальной работы в Лаборатории экологии и эволюционной биологии водных организмов ИМО ДВФУ, а также Ольге Геннадьевне Шевченко за возможность работы в Центре коллективного пользования «Приморский океанариум». Благодарю своих первых студенческих научных руководителей Владимира Владимира Мордуховича и Дмитрия Матвеевича Атопкина за помощь и поддержку в первых шагах в науку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярные маркеры как инструменты для изучения генетического разнообразия видов

Генетическое разнообразие видов является материалом для естественного и искусственного отбора. В то же время, анализируя генетическую изменчивость, можно отслеживать историю и пространственные филогенетические отношения между популяциями и видами. Эта информация может быть получена при помощи различных генетических маркеров (Pénzes et al., 2002; Semagn et al., 2006; Duran et al., 2009).

На протяжении длительного времени в качестве дискриминирующих признаков можно было использовать только видимые фенотипические различия, такие как длина, высота, масса тела, цвета, пятна и другие морфологические характеристики, что являлось серьезным ограничением при межвидовом и особенно внутривидовом анализе. Кроме того, многие из видимых и важных особенностей не определяются одним генетическим локусом. Чаще признаки кодируются несколькими генетическими локусами, что делает их использование в качестве генетических маркеров практически невозможным. Поэтому появление молекулярных маркеров было революционным прорывом в определении и использовании генетических полиморфизмов для различных целей. Первыми такими молекулярными маркерами были полиморфные белки, связанные с изоферментными вариациями одного и того же полипептида (Pénzes et al., 2002). «Аллозимы» или «аллельные изоферменты» представляют собой разные аллельные формы одних и тех же ферментов, кодируемых в одном и том же локусе (Hunter, Market, 1957; Parker et al., 1998). С 1960-х годов электрофорез аллозимов в крахмальном геле стал наиболее часто используемым молекулярным методом в генетике рыболовства и аквакультуры (Liu et al., 1992, 1996; Morizot et al., 1994).

Отличия аминокислот в полипептидной цепи различных аллельных форм фермента отражают изменения в основной последовательности ДНК. В зависимости от характера аминокислотных изменений полученные белковые

продукты под действием электрического поля могут мигрировать с разной скоростью (из-за различий в заряде и размере) при прохождении через гель. Частоту аллелей можно рассчитать по образцам полос аллозимов. Различия в относительных частотах аллелей используются для количественной оценки генетической изменчивости и дифференцирования генетических единиц на уровне популяций, видов и более высоких таксономических рангов (Allendorf, Phelps 1981; Morizot et al., 1994; Liu, Cordes, 2004). Недостатки, связанные с аллозимами, включают случайную недостаточность гетерозигот из-за нулевых (ферментативно неактивных) аллелей (Stoneking et al., 1981) и чувствительность к количеству, а также к качеству образцов тканей (Chauhan, Rajiv, 2010). Кроме того, некоторые изменения в последовательности ДНК маскируются на уровне белка, что снижает уровень обнаруживаемой изменчивости (Liu, Cordes, 2004). Низкий уровень генетической изменчивости, выявленный в аллозимных исследованиях (Crawford et al., 1989), побудил к продолжению поиска маркеров с более высоким генетическим разрешением, к примеру, к маркерам на основе ДНК.

1.2 Митохондриальная ДНК как молекулярный маркер

Митохондрии представляют собой органеллы, играющие ключевую роль в клеточных преобразованиях энергии: полученная в результате деградации субстрата, она запасается в высокоэнергетических связях аденозинтрифосфата (Drose, Brandt, 2012). Характерной особенностью митохондрий является то, что помимо клеточного ядра они являются одними из двух органоидов, содержащих ДНК; по этой причине их называют полуавтономными органеллами (Kowalczyk et al., 2021).

У большинства многоклеточных животных (Ballard, Whitlock, 2004) митохондриальный геном представляет собой небольшую замкнутую молекулу ДНК длиной от 14000 до 18000 п.н. (Mu et al., 2018), которая обычно содержит 37 генов: 13 генов, кодирующих белок, 2 гена рибосомной РНК (рРНК) и 22 гена транспортной РНК (тРНК) (Burger et al., 2003). Все 13 генов, кодирующих белки, играют ключевую роль в использовании кислорода и энергетическом обмене

(Boore, 1999; Burger et al., 2003; Xu et al., 2007). Митохондриальные геномы большинства исследованных многоклеточных животных имеют только одну контрольную область, которая участвует в инициации и регуляции транскрипции и репликации митогенома животных (Wolstenholme, 1992). Однако митохондриальные геномы некоторых животных имеют две отдельные контрольные области с идентичными или очень похожими нуклеотидными последовательностями (Ogoh, Ohmiya, 2007; Tatarenkov, Avise, 2007; Morris-Pocock et al., 2010). Наиболее часто используемые для внутривидового и популяционного уровней анализа фрагменты мтДНК включают: гены, кодирующие 12S рНК, 16S рНК, D-петлю, содержащую гипервариабельные области, гены субъединицы 1 цитохромоксидазы с (*COI*), цитохрома b (*cytb*) (Habza-Kowalska et al., 2019).

Две рибосомные рНК (12S ррНК и 16S ррНК), кодируемые митохондриальным геномом, необходимы для трансляции информационных рНК в митохондриальные белки. Гены 12S и 16S ррНК занимают 1/16 и 1/10 всего митохондриального генома соответственно (Yang et al., 2014). 16S и 12S ррНК являются относительно консервативными митохондриальными генами, эволюционирующими медленнее, чем митохондриальный геном в целом (Palumbi, 1996; Di Finizio et al., 2007). Высококонсервативные области этих локусов можно использовать в качестве сайтов связывания праймеров, в то время как мутации, существующие в вариабельных областях, делают оба гена подходящими для разграничения видов (Balitzki-Korte et al., 2005, Vences et al., 2005). Митохондриальные гены 12S ррНК и 16S ррНК использовались в качестве молекулярных маркеров для идентификации видов млекопитающих, птиц, амфибий, ракообразных и во многих других таксонах (Zhang, Ryder, 1994; Mitsuhiro et al., 2004; Pascoal et al., 2008; Wang et al., 2009; Somura et al., 2012; Yang et al., 2014).

Митохондриальная ДНК содержит некодирующую область, называемую контрольной областью (включающую D-петлю, CR-control region) из-за ее роли в репликации и транскрипции мтДНК. Сегмент D-петли демонстрирует сравнительно более высокий уровень изменчивости, чем последовательности,

кодирующие белки и РНК, из-за уменьшенных функциональных ограничений и ослабленного давления отбора (Arif, Khan, 2009). Длина D-петли составляет примерно 1000 п.н., и ее часто используют для определения молекулярного разнообразия видов (Bruford et al., 2003; Onuma et al., 2006; Wu et al., 2006).

Последовательности генов, кодирующие элементы дыхательной цепи, такие как гены цитохромов (*cytb* и *COI*), различаются между видами за счет накопления специфических мутаций (Blaxter, 2003; Kumar et al., 2019). Неполные их фрагменты успешно используются в исследованиях, посвященных филогении рыб (Johns, Avise, 1998; Hebert et al., 2002; Kartavtsev et al., 2009; Туранов и др., 2012). Ген *COI* является одним из наиболее часто используемых генов мтДНК для изучения филогеографических паттернов и истории на межвидовом и внутривидовом уровне, однако *COI* широко применяется и для эволюционных исследований беспозвоночных (De Jong et al., 2011).

Последовательность гена *COI* в настоящее время используется в методах ДНК-штрихкодирования. Метод основан на анализе определенного фрагмента ДНК, содержащегося в геноме каждого организма в похожей, но достаточно разной форме, чтобы обеспечить идентификацию на видовом уровне. Благодаря наличию общедоступного интернет-ресурса BOLD (Ratnasingham, Hebert, 2007) это направление исследования достаточно успешно.

Организация митохондриального генома позволяет создавать универсальные праймеры в консервативных участках для широкого круга видов, а изменчивость фланкированных ими фрагментов можно использовать для видовой идентификации биологических образцов неизвестного происхождения (Kowalczyk et al., 2021).

Существует несколько причин, по которым маркеры митохондриальной ДНК широко используются в исследованиях генетики животных. Прежде всего, это небольшой размер генома в сочетании с консервативным расположением генов, что позволяет чаще использовать универсальные праймеры для разных таксонов. Поэтому отсутствует необходимость априорных знаний о последовательности мтДНК конкретного вида для первичного анализа. Также митохондриальный геном

характеризуется высокой скоростью мутаций, поэтому можно обнаружить множественные генетические линии как внутри, так и между популяциями (Freeland, 2011). Содержание митохондриальных генов консервативно у животных: дубликации встречаются достаточно редко, интроны же вообще отсутствуют (Gissi et al., 2008). Наконец, поскольку мтДНК гаплоидна и наследуется от одного родителя, она фактически составляет четверть от эффективного размера популяции, оцениваемой по диплоидной ядерной ДНК (Moore, 1995). Как следствие, мтДНК чувствительна к демографическим событиям в результате стохастических причин, таких как «эффект основателя» и «горлышко бутылки» (Galtier et al., 2009).

Маркеры мтДНК подвержены тем же проблемам, которые существуют для других маркеров на основе ДНК. К ним относятся: обратные мутации (сайты, которые уже подверглись замещению, возвращаются в исходное состояние), параллельные замены (мутации происходят на одном и том же сайте в независимых линиях) и гетерогенность скорости накопления нуклеотидных замен в разных участках молекулы. Кроме того, возникают технические проблемы, связанные с наличием ядерных интеграций последовательностей мтДНК (Hurst, Jiggins, 2005). МтДНК, интегрированная в ядерный геном, все еще может амплифицироваться с консервативными праймерами, нацеленными на митохондриальные копии, усложняя анализ (Bensasson et al., 2001).

МтДНК не защищена ни от положительного отбора, ни от неустойчивой скорости эволюции, а рекомбинации чрезвычайно редки (Galtier et al., 2009). Находясь в метаболически активной, сильно окислительной среде, мтДНК претерпевает сложный процесс мутации, сильно изменчивый в пространстве и времени. Что наиболее важно, распространенность этих многочисленных смешанных эффектов в значительной степени неизвестна и, очевидно, варьирует в зависимости от таксона (Galtier et al., 2009).

Первые анализы мтДНК были основаны на полиморфизме длин рестриционных фрагментов (ПДРФ), полученном после расщепления генетической мтДНК ферментами рестрикции (Brown, 1980). В настоящее время

преобладают методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот в полимеразной цепной реакции. Этот метод, разработанный в 1980-х годах (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986), позволяет амплифицировать выбранный фрагмент генома, фланкированный участками, специфичными для праймеров. В настоящее время ПЦР представляет собой автоматизированный процесс, что снижает возможность возникновения разного рода ошибок. Дальнейшие шаги включают секвенирование, определение нуклеотидных последовательностей и биоинформатический анализ результатов. Молекулярный анализ существенно облегчается биоинформационными базами данных, такими как NCBI (National Center for Biotechnology Information, США) или Ensembl (<https://www.ensembl.org>), содержащими нуклеотидные последовательности, а также приложениями, используемыми для их сравнения.

1.3 Микросателлиты как молекулярные маркеры

Микросателлиты - особый класс ДНК-маркеров с большим количеством (примерно до сотни раз) тандемно повторяющихся идентичных элементов от одного до шести пар нуклеотидов (Chambers, MacAvoy, 2000). Они также называются простыми повторяющимися последовательностями (simple sequence repeats, SSR) или короткими тандемными повторами ДНК (short tandem repeats, STR).

Функции микросателлитов *in vivo* многообразны. Последовательности SSR способны образовывать широкий спектр необычных структур ДНК с простыми и сложными петлевыми паттернами. Например, шпилька, образованная повтором $(CCG)_n$ и триплекс, образованный $(GAA)_n/(TTC)_n$, могут оказывать влияние на экспрессию генов (Li et al., 2002). Было показано, что короткие триплетные повторы образуют обширные вторичные структуры в одноцепочечной ДНК. Более длинные $(CAG)_n$ и $(CTG)_n$ повторы производят необычные вторичные структуры после денатурации и последующей ренатурации (Pearson, Sinden, 1996). Образование таких стабильных структур обеспечивает уникальные мотивы для распознавания белками.

Повторяющиеся последовательности динуклеотида являются предпочтительными сайтами для рекомбинации из-за их высокого сродства к рекомбинантным ферментам (Biet et al., 1999). Некоторые последовательности микросателлитов могут воздействовать на рекомбинацию непосредственно за счет их влияния на структуру ДНК. Было высказано предположение, что связывающие белки с GT, CA, CT, GA, GC или AT повторами могут участвовать в процессах рекомбинации путем индуцирования Z- конформации или других альтернативных вторичных структур ДНК (Li et al., 2002).

SSR способны действовать на ферменты, контролирующие клеточный цикл. Например, ген *CHK1* человека играет определенную роль в контроле клеточного цикла, а его кодирующая область содержит (A)₉ фрагмент, который является потенциальным сайтом мутаций в опухолях с измененными микросателлитами (Bertoni et al., 1999).

Микросателлитные локусы, расположенные в зонах промотора, могут влиять на экспрессию генов. Было обнаружено, что последовательность (TC)_n в зонах промотора служит в качестве элемента транскрипционного контроля гена белка теплового шока *hsp26* у *Drosophila*, *Aspergillus* и *Phytophthora* (Li et al., 2002). Удаление различных ди-, три- и тетрануклеотидов заметно меняло транскрипционную активность. Например, транскрипционная активность промоторов резко снижалась путем делеции фрагмента (TCCC)_n из промоторных областей гена *c-KI-ras* (Hoffman et al., 1990).

В одном из исследований (Pathak et al., 2013) было обнаружено, что 70% клонов РНК, выделенных из ДНК дрозофилы, содержат микросателлиты AAGAG, транскрибируемые с обеих цепей ДНК и, вероятно, происходящие из перицентромерных областей, в которых преобладают AAGAG-повторы. Другим видом РНК, в котором микросателлиты могут оказывать какое-либо действие, является микроРНК. Способность этих коротких РНК регулировать транскрипцию была широко изучена на растениях (Bagshaw, 2017).

Аллели в микросателлитных локусах могут быть амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции из небольшого количества геномной

ДНК. Индивидуальные аллели в локусе отличаются количеством тандемных повторов и могут быть точно дифференцированы на основе электрофореза в зависимости от их размера (Tautz, 1989).

Было предложено несколько механизмов для объяснения высокой скорости мутаций микросателлитов, включая ошибки во время рекомбинации, неравномерный кроссинговер и «проскальзывание» полимеразы во время репликации или репарации ДНК (Strand et al., 1993). Левинсон и Гутман (Levinson, Gutman, 1987) обнаружили, что штаммы *Escherichia coli* с или без функциональной рекомбинационной системы имеют аналогичную скорость мутации, что указывает на то, что рекомбинация не является преобладающим механизмом в создании микросателлитной изменчивости.

При неравномерном кроссинговере может происходить потеря или увеличение числа повторов. Когда присутствуют повторяющиеся области микросателлитов, то во время контакта может образовываться шпилька. Следовательно, одна хромосома будет получать более длинный фрагмент ДНК из-за большего количества замененных микросателлитных повторов, гомологичная хромосома одновременно получает меньшее количество повторов (Oliveira et al., 2006).

Во время репликации или репарации ДНК может произойти проскальзывание ДНК-полимеразы, в которой одна ДНК-цепь временно диссоциирует от комплементарной цепи и быстро восстанавливается в другом положении. Это приводит к ошибкам спаривания оснований, продолжению элонгации и увеличению числа повторов в аллеле. Мутации в генах системы репарации ДНК существенно увеличивают (до 700 раз) микросателлитную нестабильность в клетках (Kolodner, Marsischky, 1999).

Большинство микросателлитных мутаций, возникающих при проскальзывании репликации, быстро корректируются, главным образом с помощью системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair mechanism, MMR). Эффективность репарации снижается по мере увеличения размера и/или стабильности цикла, возникающего при проскальзывании

репликации. Эти две характеристики, в свою очередь, подвержены влиянию других факторов, присущих микросателлитам. Среди них можно указать длину аллеля, длину мотива, нуклеотидную композицию, геномное положение повтора и т.д. (Jentsch et al., 2008).

Проскальзывание репликации также происходит при амплификации микросателлитных последовательностей *in vitro*. Характерной особенностью этого процесса является наличие «заикающихся полос» или «теневых полос», где каждый аллель представляет собой серию фрагментов, кратных длине повторяющейся единицы микросателлита (Галинская и др., 2019). Эксперименты показывают, что скорость проскальзывания *Taq*-полимеразы возрастает с количеством повторяющихся единиц. Тетрануклеотидные маркеры обычно дают меньше полос, чем ди- и мононуклеотидные повторы (Ellegren, 2004).

SSR часто высокополиморфны в связи с варьированием числа повторов. Они могут быть обнаружены с помощью полимеразной цепной реакции с использованием двух уникальных олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют локус (Powell et al., 1996). Из-за их многоаллельной природы, кодоминантного наследования, малой длины и обширного распределения по всему геному микросателлиты успешно применяются в самых разных областях исследований и практических дисциплин.

Генетическое картирование представляет собой одно из основных направлений, в которых применяются микросателлитные маркеры. SSR высокополиморфны, информативны и требуют небольшого количества ДНК. Способы их обнаружения могут быть легко автоматизированы (Chistiakov et al., 2006).

Микросателлиты представляют собой кодоминантные маркеры ДНК. Для каждого SSR потомство наследует один аллель от отца, один от матери. Этот простой шаблон наследования может объяснить чрезвычайную популярность полиморфных локусов при тестировании отцовства. Используя панель из нескольких микросателлитных локусов, для каждого испытуемого может быть создан уникальный комбинированный профиль генотипа SSR. Микросателлиты

широко используются для анализа отцовства и родства в естественных популяциях (Sekino et al., 2001; Gomes et al., 2013; Batishcheva, Brykov, 2021), а также для торгового контроля рыбных продуктов, в том числе аквакультуры (Liu, Cordes, 2004). Имеются соответствующие математические инструменты для оценки генетического родства и наследования в этих системах (Jones, 2005; Jones, Wang, 2010).

Поскольку микросателлитные маркеры обычно селективно нейтральны и часто представляют собой нефункциональные последовательности (Abdul-Muneer, 2014), они не могут быть определены как локусы, непосредственно ответственные за фенотип болезни. Тем не менее, SSR могут находиться в сцеплении с другими функциональными генетическими элементами, которые связаны с патологическим фенотипом. Эти ассоциированные с заболеванием маркеры обычно представлены однонуклеотидными полиморфизмами или SNP (single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм). Они часто являются функционально релевантными и, следовательно, могут отвечать за определение патогенных фенотипов (Chistiakov et al., 2006).

Молекулярная структура и генетическая изменчивость микросателлитов широко используются в эволюционных исследованиях генетического разнообразия видов. Подавляющее их большинство направлено на изучение филогенетических отношений между популяциями или между недавно дивергировавшими видами. Однако высокая частота гомоплазии с увеличением эволюционной дистанции может скомпрометировать точность филогенетического вывода (Jarne, Lagoda, 1996). Для определения родственных связей между семействами и видами более целесообразно использовать фланкирующие области микросателлитов, поскольку их скорость мутации гораздо ниже, чем у SSR (Chistiakov et al., 2006).

Микросателлитные локусы чувствительны к колебаниям размера популяции и ее эффективной численности. Поскольку SSR эволюционируют в $10^2 - 10^3$ быстрее, чем ядерная ДНК, они являются мощным инструментом анализа недавних популяционных событий, определения генетического разнообразия и

популяционной структуры (Soliman et al., 2012; Giantsis et al., 2014; Li et al., 2019; Wang et al., 2021).

Высокая скорость мутаций микросателлитов приводит к высокому аллельному разнообразию. У видов с небольшим количеством популяций или прошедшим через «горлышко бутылки» маркеры с более низкими скоростями мутаций, такие как аллозимы, могут быть в значительной степени инвариантными, и только локусы с самыми высокими показателями мутации будут информативны (Hedrick, 1999; Kalinowski, 2002).

Несмотря на многие преимущества, микросателлитные маркеры также имеют некоторые проблемы, которые усложняют анализ данных и ограничивают их применение. Для амплификации микросателлитных локусов с помощью полимеразной цепной реакции необходимо разработать праймеры, фланкирующие специфические микросателлитные повторы. Эти участки ДНК являются одними из самых переменных в геноме, поэтому пара микросателлитных праймеров редко работает для широкого круга таксономических групп в связи с большой мутационной скоростью, поэтому праймеры обычно разрабатываются отдельно для каждого вида (Glenn, Schable 2005).

Идентификация аллелей на основе их размера значительно сокращает время и затраты на генотипирование микросателлита по сравнению с секвенированием каждого аллеля у каждой особи. Однако этот тезис требует предположения, что все отдельные аллели различаются по длине. Фактически, на практике можно столкнуться с явлением гомоплазии. Существуют два разных типа гомоплазии: наблюдаемая и скрытая. Наблюдаемая гомоплазия может быть выявлена путем секвенирования аллелей. Например, точечные мутации оставляют размер аллеля неизменным, а вставки или делеции во фланкирующей области могут создать новый аллель с тем же размером, что и существующий аллель. Эмпирические оценки наблюдаемой гомоплазии свидетельствовали лишь о небольшой (1-2%) недооценке генетической дифференциации (Adams et al., 2004; Curtu et al., 2004). Скрытая гомоплазия возникает, когда два аллеля идентичны по последовательности, но не идентичны по происхождению (то есть имеют разные

генеалогические истории). Такая ситуация возникает из-за случайного поэтапного мутационного процесса, когда осуществляется повторная мутация к ранее существующему размеру (например, аллель мутирует от 5 до 6 повторов, а затем копия этого аллеля мутирует от 6 до 5 повторов). Существует и другой сценарий, при котором два несвязанных аллеля сходятся последовательно, изменяя число повторений в двух разных местах последовательности. При высокой скорости мутаций скрытая гомоплазия может быть обширной, но ее возможно учесть в анализах (Slatkin 1995; Cornuet et al., 1999).

Хотя микросателлиты в принципе являются кодоминантными маркерами, мутации в сайтах отжига праймеров могут приводить к появлению нулевых аллелей. Нулевой аллель - любой аллель в микросателлитном локусе, который постоянно не амплифицируется с помощью полимеразной цепной реакции (Dakin, Avise, 2004). Исследования показали (Grimaldi, Crouau-Roy 1997), что во фланкирующих локус областях происходят мутации, препятствующие отжигу праймеров с матричной ДНК во время ПЦР и приводящие к нулевым аллелям. Другие возможные причины возникновения нуль-аллелей включают предпочтительную амплификацию коротких аллелей из-за непостоянства качества или количества матрицы ДНК (Chapius, Estoup, 2007) или проскальзывание ДНК-полимеразы во время амплификации (Ellegren, 2004). Наличие нулевых аллелей приводит к появлению ложных гомозигот, которые влияют на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга и ведут к некорректной интерпретации результатов (Carlsson, 2008).

Одной из проблем при использовании микросателлитных маркеров является определение оптимального количества микросателлитных локусов для популяционного анализа. При проведении популяционно-генетических исследований объем выборки и число микросателлитов играют очень важное значение. Было показано (Hale et al., 2012), что изменчивость частоты аллелей и ожидаемая гетерозиготность среди повторов снижались с увеличением размера выборки, но это снижение было минимальным при размерах выборки от 25 до 30. При числе исследованных микросателлитных локусов менее 6 многие

популяционные характеристики, такие как, например, аллельное разнообразие, гетерозиготность, коэффициенты дифференциации, в том числе и число выделяемых субпопуляций и другие, отклоняются от истинных значений, и эти отклонения высоко достоверны (Koskinen et al., 2004; Reiner et al., 2019). При изучении популяций благородного оленя (Reiner et al., 2019) использование 8 и менее числа SSR привело к чрезмерному увеличению числа оцениваемых субпопуляций. Однако авторы отмечают, что данные из разных популяций не могут быть легко интерпретированы на основе данных других исследований. Этот вывод особенно касается диких популяций.

В то же время, использование слишком большого количества маркеров может увеличить количество ошибок генотипирования, что приведет к появлению ложных генотипов и завышенным оценкам размера популяции (Creel et al., 2003). Поэтому некоторые исследователи проводят работы с использованием наименьшего числа микросателлитных локусов. Продемонстрировано, что для изучения размера популяции дикого кабана (Kolodziej et al., 2012) число маркеров можно сократить до 4 без изменения результата. В экспериментальных исследованиях на *Drosophila nigrosparsa* (Arthofer et al., 2018) показано, что большая часть особей все еще может быть правильно отнесена к исходной популяции при использовании восьми локусов, а структура популяции сохраняется с применением только двух высокополиморфных локусов.

Подводя итог, можно сделать вывод, что конкретное число используемых локусов будет зависеть от цели исследования. Для определения числа кластерных групп или предварительной оценки популяционной структуры подходит небольшое число маркеров, для более точного исследования необходимо адекватно увеличивать число локусов, чтобы их количество не привело к искажению результата вследствие ошибок генотипирования.

1.4 Общее представление об объекте исследования

1.4.1 Систематика, биология и экология *Apostichopus japonicus*

Дальневосточный трепанг был описан Зеленка в 1867 г. (Selenka, 1867 – цит. по: Левин, 1982) и назван *Stichopus japonicus*. Позднее, этот вид был отнесен к новому роду – *Apostichopus* (Liao, 1980 – цит. по: Levin, 1999). На основе значительных различий между *A. japonicus* и типовыми видами рода *Stichopus* (Левин и др., 1986) была обоснована (Levin, 1999) необходимость отделения *A. japonicus* от рода *Stichopus*. В литературе встречаются различные варианты русскоязычных названий, мы будем придерживаться его наименования как «дальневосточный трепанг», рекомендованное Левиным (Левин, 1982, стр. 9). В настоящее время вид официально включен в монотипный род *Apostichopus* и назван *A. japonicus* во Всемирном реестре морских видов, World Register of Marine Species (Paulay, 2013):

Тип Echinodermata Klein, 1778

Подтип Echinozoa Haeckel, 1895

Класс Holothuroidea de Blainville, 1834

Подкласс Actinopoda Ludwig, 1891

Отряд Synallactida Miller et al., 2017

Семейство Stichopodidae Haeckel, 1896

Род *Apostichopus* Liao, 1980

Вид *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867)

Apostichopus japonicus – животное, ведущее бентосный образ жизни. В длину достигает до 40 см, в диаметре – до 9 см. Масса тела в некоторых случаях приближается к 1.5 кг, промыслового размера достигает при массе тела около 130 г в 2-3 года. Продолжительность жизни отдельных особей обычно оценивается как минимум в пять лет (Qiu et al., 2015), может жить до 10-11 лет (Левин, 1982). Имеется 4 цветовых формы: красная, черная, зеленая, а также белая (Zhao, 2015).

A. japonicus распространен в прибрежных водах Желтого, Восточно-Китайского, Японского и на самом юге Охотского морей (рис. 1) (Левин, 2000). Места обитания дальневосточного трепанга - в бухтах и у открытых участков

побережья на грунтах различных типов, за исключением жидких илов и подвижных песчаных грунтов. Массово наблюдаются на смешанных грунтах, возле зарослей водорослей (среди полей красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* – см. Dubrovskii, Sergeenko, 2002), а также поселений двустворчатых моллюсков. Взрослые особи живут на глубинах 0.5-150 м, обычно от 1 до 25 м, молодь – от литорали до 20 м. Встречается при температуре воды от отрицательной до 26-28°C (Левин, 2000).

Высокая температура морской воды летом вызывает состояние покоя, известное как эстивация, почти у 100% половозрелых особей. Во время этой фазы *A. japonicus* претерпевает значительную потерю тканей, снижение скорости метаболизма и модификацию иммунной системы. Когда дальневосточный трепанг подвергается стрессовым условиям, он может потерять большую часть своих внутренних органов, которые впоследствии регенерируют (Wang et al., 2015).

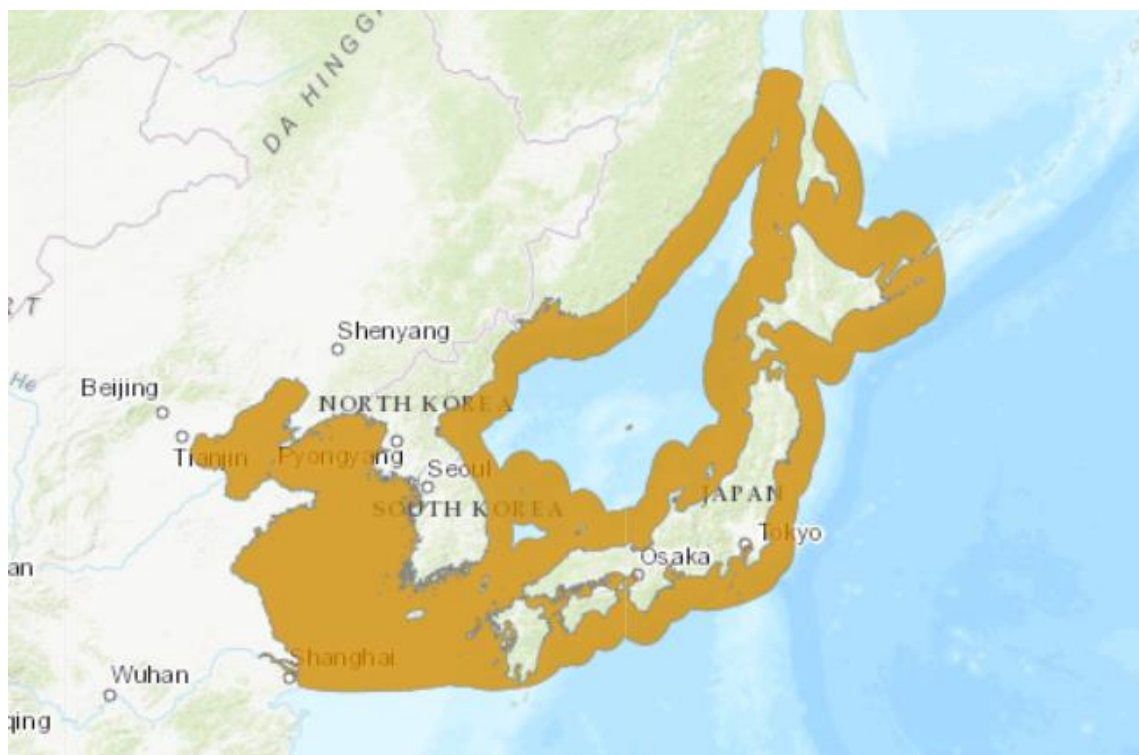


Рисунок 1 - Ареал *Apostichopus japonicus* (Hamel, Mercier, 2013).

Основную часть рациона *A. japonicus* составляет ил, морские растения, фрагменты раковин моллюсков и скелетные элементы иглокожих, а также частицы детрита. Некоторые исследования показывают наличие мейобентосных

организмов и микроорганизмов в пищеварительной системе дальневосточного трепанга (Бирюлина, 1972).

A. japonicus – раздельнополое животное; случаи гермафродитизма у этого вида не подтверждены документально, но и внешний половой диморфизм не выражен (Мокрецова, 1978). Время наступления половой зрелости дальневосточного трепанга сложно указать точно (Левин, 1982), так как определение возраста голотурий затруднено, а также может зависеть от индивидуальных условий развития и роста, географического положения, условий места обитания и т.д. По некоторым данным (Wang, 2015), половая зрелость достигается в возрасте около двух лет. Срок начала размножения зависит и от веса особи – в одних источниках вес указан от 110 г (Purcell et al., 2012), в других – около 250 г (Wang, 2015).

Репродуктивный цикл *A. japonicus* годовой (Purcell et al., 2012). Продолжительность и сроки нереста варьируют; нерестовый период в общем охватывает 7 месяцев – с марта по сентябрь (Левин, 1982). Динамика развития гонад изменяется в основном в зависимости от факторов окружающей среды, которые колеблются в разных географических районах ареала (Wang, 2015). Было установлено, что в зал. Петра Великого нерест *A. japonicus* происходит при температуре морской воды от 18 до 25 °С (Гаврилова, 1995).

Жизненный цикл *A. japonicus* можно разделить на восемь основных стадий развития следующим образом: оплодотворение, бластула, гастрюла, аурикулярия, долиолярия, пентактула, ювенильная и взрослая особи (Hu et al., 2010; Wang et al., 2010). В одной гонаде дальневосточного трепанга может находиться от 0.5 до 77 миллионов яиц. После оплодотворения и образования клетками бластулы жгутиков личинка выходит из желточной оболочки и ведет свободноплавающий образ жизни (Мокрецова, 1978).

На двенадцатый день после оплодотворения поздняя личинка пентактулы впервые использует свои щупальца для прикрепления к субстрату (Qiu et al., 2015). Следующие 3–5 дней являются критическим периодом для ее оседания. Только что осевшим личинкам требуется 30–40 дней, а иногда и больше из-за выраженной

индивидуальной изменчивости размеров, чтобы стать ювенильной, похожей на взрослую по внешнему виду и функциям органов (Qiu et al., 2015).

1.4.2 Промысловое значение *Apostichopus japonicus*

Дальневосточный трепанг - важный промысловый вид в Северо-Восточной Азии. Терапевтические свойства и лечебные преимущества могут быть связаны с наличием широкого спектра биоактивных веществ (Bordbar et al., 2011). С питательной точки зрения *A. japonicus* обладает рядом уникальных биологических и фармакологических свойств и содержит различные биологически активные компоненты, такие как пептиды, жирные кислоты, гликозаминогликаны (хондроитин/фукансульфаты), нортритерпеновые/тритерпеновые гликозиды, другие экстракты и гидролизаты (Oh et al., 2017).

Основной потребитель *A. japonicus* - Китай, небольшая часть продукта экспортируется в Европу, в частности, в Гамбург (Германия). Импорт этого вида осуществляется в страны Азии, Африки, острова южной Пацифики, Австралии (Левин, 2000). Ценность дальневосточного трепанга привела к интенсификации его промысла и браконьерству, что в конечном итоге сказалось на сокращении численности популяций в местах его обитания. На территории Приморья ведется наблюдение за изменением численности *A. japonicus*. В 2000 г. было показано (Селин, 2001), что из-за сокращения численности взрослых особей и увеличения доли молодежи произошло снижение биомассы животных в зал. Восток. Согласно исследованию, проведенному в 2003-2008 гг. (Подкорытов, Масленников, 2015), в Амурском зал. было отмечено уменьшение средней массы тела дальневосточного трепанга, что авторы связывают с промысловой нагрузкой. Оценка состояния *A. japonicus* проведена в Дальневосточном морском заповеднике в 2013 и 2015 годах (Лысенко и др., 2015; Лысенко и др., 2018). Было показано, что численность *A. japonicus* после браконьерского промысла стабилизировалась, и он не находится под угрозой исчезновения. Однако средняя плотность поселений дальневосточного трепанга примерно в 20 раз ниже плотности, при которой был начат незаконный

его вылов, следовательно, *Apostichopus japonicus* все еще нуждается в охране (Лысенко и др., 2018).

1.4.3 Генетические исследования *Apostichopus japonicus*

Сокращение размера популяции может привести к уменьшению генетического разнообразия, репродуктивной приспособленности и ограниченной способности адаптироваться к изменениям окружающей среды, что увеличивает риск исчезновения (Furlan et al., 2012). В настоящее время ведутся исследования по изучению запасов дальневосточного трепанга и восстановлению его численности, в том числе при помощи искусственного выращивания в условиях марикультуры (Гаврилова, 2013; Yan et al., 2013). Генетические карты *A. japonicus* были построены на основе AFLP (amplified fragment length polymorphism, полиморфизм длины амплифицированных фрагментов), микросателлитных и SNP-маркеров (Li et al., 2009; Yan et al., 2013; Tian et al., 2015), что открывает путь для разработки генетической карты высокого разрешения и картирования функциональных генов и локусов количественных признаков для дальнейшего применения стратегии селекции у этого вида. Исследования по обширному анализу на уровне транскриптома индивидуальной изменчивости роста дальневосточного трепанга (Gao et al., 2017) предоставили полезный материал для дальнейших генетических и геномных исследований и должны помочь в селекции *A. japonicus* для отбора наиболее быстрорастущих особей. Полученные данные по транскриптому *A. japonicus* на разных стадиях развития (Boyko et al., 2019) могут быть использованы в программах промышленной селекции дальневосточного трепанга. Получен черновик структуры генома *A. japonicus*, что также станет бесценным ресурсом для геномных исследований этого вида (Jo et al., 2017).

Для описания генетической изменчивости дальневосточного трепанга и структуры популяций применяются и разрабатываются в основном микросателлитные маркеры (Kanno et al., 2005; Zhan et al., 2007; Kang et al., 2011; Chen et al., 2013) и однонуклеотидные полиморфизмы (Du et al., 2012; Dong et al., 2016). Были проведены исследования генетической структуры и разнообразия

A. japonicus в заливе Тояма (Япония), показаны генетические различия между красным и зеленым вариантами дальневосточного трепанга. В результате были приведены рекомендации для рассмотрения каждой популяции как самостоятельной структуры для учета их среды обитания и дальнейшего промысла (Soliman et al., 2012). Исследования генетической дифференциации между разными цветовыми формами дальневосточного трепанга проводились и в других частях ареала вида (Kanno et al., 2006; Kang et al., 2011). Тестирование генетической дифференциации среди цветовых типов показало сильную гетерогенность красного *A. japonicus*.

Полученные статистические значения микросателлитных локусов при изучении дальневосточного трепанга из различных локальностей побережья Южной Кореи демонстрировали обособленность выборок друг относительно друга. В этой части ареала вида наблюдаемая гетерозиготность была меньше ожидаемой, что авторы объясняют действием естественного отбора и неслучайным скрещиванием (Kim et al., 2008).

Сходные гетерогенность выборок *A. japonicus* и недостаток гетерозигот описывают и китайские исследователи (Chang et al., 2009). Отличия в значениях наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности авторы связывают с возможным эффектом Валунда, выпуском в акваторию искусственно выращенного дальневосточного трепанга, а также наличием нуль-аллелей, что приводит к ошибкам генотипирования и уменьшению реального числа гетерозигот.

Анализ генетического статуса диких и марикультурных популяций необходим для поддержания генетического разнообразия объекта исследования. С помощью микросателлитных маркеров была определена генетическая дифференциация между дикой и заводской популяцией *A. japonicus* у о. Чеджу (Южная Корея; An et al., 2013). В заводских выборках была выявлена потеря уникальных аллелей и относительно высокое значение коэффициента инбридинга. Одновременно было обнаружено статистически значимое снижение гетерозиготности и/или аллельного разнообразия в заводской популяции по

сравнению с дикой популяцией. Между двумя популяциями была обнаружена и значительная генетическая гетерогенность.

Сравнение дикой и заводской популяций дальневосточного трепанга было проведено в Китае (Chen et al., 2008). Результаты, полученные с применением микросателлитов, не дают основания полагать, что практика разведения этого вида в Китайской Народной Республике на сегодняшний день существенно повлияла на генетическую изменчивость выращиваемого *A. japonicus*. Значимая дифференциация была обнаружена между большинством пар природных и заводских популяций, между дикими популяциями не было обнаружено гетерогенности.

Информация о генетической изменчивости и дифференциации, полученная в исследованиях (Kanno et al., 2006; Kim et al., 2008; Chen et al., 2008; Chang et al., 2009; Kang et al., 2011; Soliman et al., 2012; An et al., 2013), может быть применена для будущего генетического мониторинга популяций *A. japonicus*, а также для разработки подходящих мер по сохранению этого вида на протяжении всего ареала.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования – дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus*

В работе исследовано пять выборок *A. japonicus* (табл. 1), собранных водолазным способом в зал. Петра Великого Японского моря в 2015 и 2018 гг. (рис. 2). Продольные мышцы тела фиксировались в 96% этаноле.

Таблица 1 - Данные об исследованных выборках *Apostichopus japonicus*

№	Локальность	Обозначение	Объем выборки		Время сбора
			микросателлиты яДНК	COI мтДНК	
1	зал. Восток, зал. Петра Великого	Vos	43	29	июль 2015
2	мыс Красный, Амурский зал., зал. Петра Великого	Krs	22	20	июнь 2015
3	зал. Посъета, зал. Петра Великого	Pos15	39	25	июль 2015
4	бухта Федорова, Амурский зал., зал. Петра Великого	Fed	29	21	июнь 2015
5	зал. Посъета, зал. Петра Великого	Pos18	26	22	июль 2018

2.2 Выделение ДНК

Экстракция ДНК проводилась методом щелочного лизиса (Truett, 2006) с использованием двух реагентов: лизирующего реагента (25мМ NaOH/0.2 мМ ЭДТА, рН 12) и Tris HCl буфера (40 мМ Tris HCl, рН 5). В пробирки с тканями *A. japonicus* был добавлен лизирующий реагент объемом 150 мкл, после чего в течении 30 мин при температуре 95 °С они были инкубированы. После остывания до комнатной температуры был добавлен Tris HCl буфер объемом 150 мкл для нейтрализации.

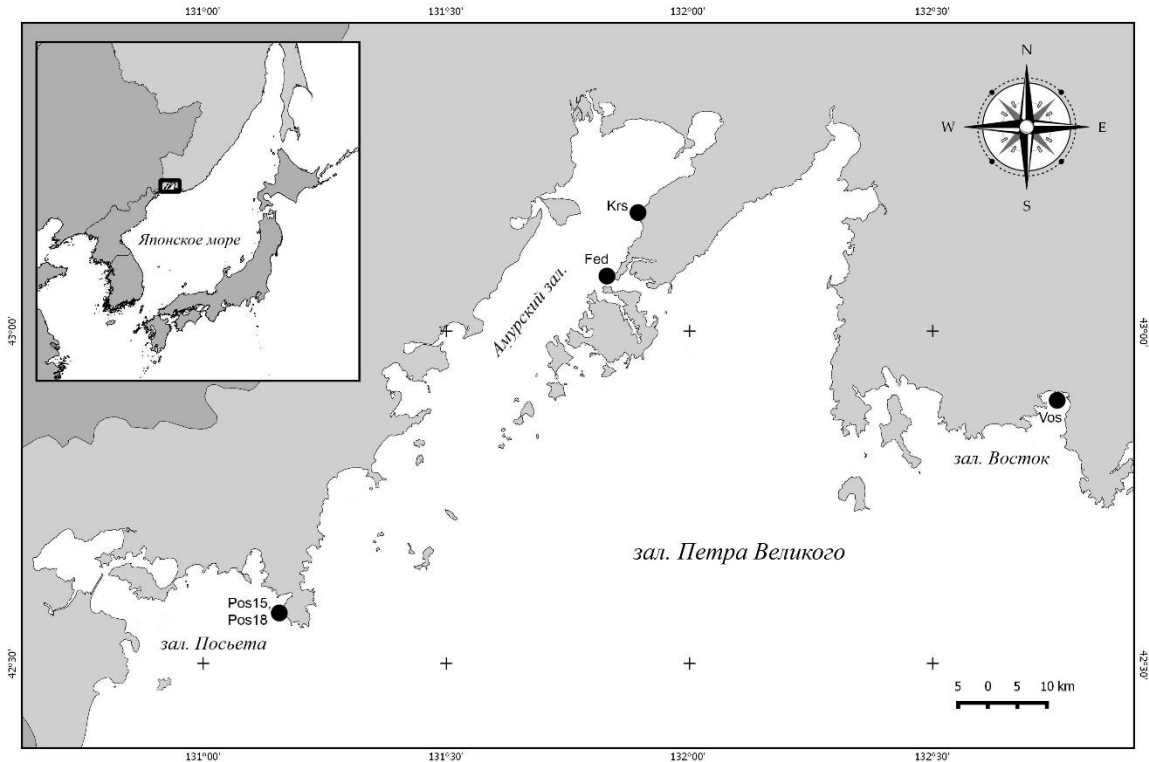


Рисунок 2 - Географическое положение исследованных выборок *Apostichopus japonicus* (Yagodina et al., 2022).

2.3 Анализ мтДНК *Apostichopus japonicus*

2.3.1 Амплификация мтДНК и секвенирование

Фрагмент гена *COI* мтДНК амплифицировали с использованием праймеров COIce-F (5'-ACTGCCACGCCSTAGTAATGATAT TTTTATGGTNATGCC-3') и COIce-R (5'-TCGTGTGTCTACGTCCATT CCTACTGTRAACATRTG-3') (Hoareau, Boissin, 2010). ПЦР для каждого образца ДНК проводилась в реакционной смеси объемом 25 мкл с использованием Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, США), 10 мМ dNTPs (каждого); 10 мМ прямого и обратного праймера (каждого); 40-60 нг тотальной ДНК, деионизованной воды. Проведение ПЦР осуществлялось на базе лаборатории «Экология и эволюционная биология водных организмов» ИМО ДВФУ.

Условия для амплификации были следующие: начальная денатурация при 94 °С в течение 2 мин, далее для 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 сек., отжиг

при 49 °C – 45 сек., элонгация при 72 °C – 1 мин.; финальная элонгация при 72 °C – 5 мин.

Продукты ПЦР визуализировали в 1.5% агарозном геле в трис-боратном электродном буфере (890 mM Трис-(гидроксиметил) аминметан, 890 mM борная кислота, 20 mM ЭДТА, pH 8.3.), содержащем бромид этидия (10 мг/мл).

Очистка ПЦР-продуктов осуществлялась с использованием экзонуклеазы I (ExoI) и термочувствительной щелочной фосфатазы (FastAP; ThermoFisher Scientific, США). Реакция проводилась в амплификаторе по следующему протоколу: инкубация при температуре 37 °C в течение 30 мин, при температуре 80 °C – 15 мин.

Реакцию терминирующего синтеза (секвенальную реакцию) выполняли в 10 мкл реакционной смеси с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США) в амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 96 °C в течение 1 мин с последующими 35 циклами денатурации при 96 °C в течение 10 сек, отжига при 55 °C в течение 5 сек и элонгацией при 60 °C в течение 4 мин. Продукты секвенальной реакции очищали с использованием спиртовой преципитации. Детекцию флюоресцентных меток (секвенирование) проводили в генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) на базе Кафедры клеточной биологии и генетики ИМО ДВФУ.

2.3.2 Статистическая обработка данных мтДНК

Сборку последовательности проводили в программе Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au>). Все полученные последовательности были выровнены в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021) с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004). Итоговая длина последовательности составила 554 п.н.

Показатели молекулярного разнообразия - количество гаплотипов, частота гаплотипов, количество полиморфных сайтов (s), гаплотипическое разнообразие (h), нуклеотидное разнообразие (π) и среднее количество нуклеотидных различий (k) - рассчитывали в программе DnaSP 6.12.03 (Rozas et al., 2017) при параметрах по умолчанию.

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 квадратичных 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). Параметры симуляции основаны на числе полиморфных сайтов для каждой гаплогруппы и генеральной совокупности выборок и нулевой рекомбинации. Вероятность ($P < 0.001$) оценена при 10000 перестановок.

Тестирование уровня дифференциации с использованием критерия χ^2 , а также определение потока генов (Nm , Hudson et al., 1992) между выборками *Apostichopus japonicus* проведено в программе DnaSP 6.12.03 (Rozas et al., 2017). Дифференциация между выборками была оценена при помощи показателя F_{st} (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) в программе Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, Lischer 2010). Вероятность критериев (P) оценена при 10000 случайных перестановок.

Дивергенция гаплотипов проанализирована с использованием двухпараметрической модели Кимуры ($K2p$; Kimura, 1980); все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были устранены. Наиболее подходящая модель $K2p$ была выбрана на основе информационного критерия Акаике (AIC; Akaike 1974). P -дистанции (Nei, Kumar, 2000) рассчитывали в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Деревья для эвристического поиска были построены в MEGA 11 с применением метода объединения соседей (neighbor-joining, NJ; Saitou, Nei, 1987) на основе $K2p$ -дистанций, а также метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA; Sokal, Michener, 1958) на основе p -дистанций. Устойчивость топологии дерева оценивали с помощью бутстрэп-анализа (BS, 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>) с 1000 репликами начальной загрузки (Felsenstein, 1985).

Анализ распределения числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) для оценки демографической экспансии популяции проведен в соответствии с рекомендациями (Schneider, Excoffier, 1999) для каждой выборки, суммарно по ареалу и для выделенных гаплогрупп с 10000 репликами начальной загрузки в программе Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, Lischer 2010).

2.4 Анализ микросателлитных локусов яДНК *Apostichopus japonicus*

2.4.1 Амплификация ДНК и определение длины фрагментов полученных ПЦР-продуктов

В полимеразной цепной реакции использовали праймеры, представленные в таблице 2. К 5'-концу каждого прямого праймера лигирован хвост M13 (TGGAACAGCTATGACCATG), который был помечен одним из четырех флуоресцентных красителей: ROX, 6FAM, R6G или TAMRA (компания «Синтол», Россия).

Таблица 2 - Последовательности 10 микросателлитных маркеров яДНК *Apostichopus japonicus*

Локус	Повтор	Последовательности праймеров (5'-3')	T отжига (°C)	Источник
AJ20333	(AGT) ₇	F: CGTCGACCAAAGAGAGCAAT R: TCCCTGGACTGGCACTAATC	60	Chen et al., 2013
AJ10675	(TAG) ₅	F: AGATGTCAGCCACATGCAAC R: GGTAAGCTTGTGGGAATGGA		
AJ13361	(CAG) ₅	F: TGGAAGACGAAGATGAGCAA R: GGAATGACCCTACGTCCAAA		
PS205	(CA) ₁₂	F: GACTACTATAGCAGTGACCTCG R: GTTTACATCTATCCATGTGATTG	56	Peng et al., 2012
3S16	(AG) ₁₀ GTG(GA) ₂₂	F: TTATCCTCATCCATACCGTC R: AAGTTATCTGTTCACCGTCG	58	
Psj1828	(CA) ₈	F: CAAACGCATACAATTACACA R: CGATCGATAGTCCTCAATC	59	Kanno et al., 2005

Psj2889	(CA) ₈	F: CGAGACGTTTACTTCCACTG R: AGAGGTTGCTGGCTTTACTC		
Psj2409	(CA) ₁₁ (AT) ₆	F: GCAGGAGGATCTAAAATACAT R: ATCGAACACAACACACTTATC	61	
Psj2464	(CA) ₆	F: GTCTCATCAGCAATCCACCA R: TCTCTCCCTACCCCAAACAC	56	
FCS9	(AG) ₆	F: GAGAAAGTGTGTGCATGCG R: AGGCGAGTCCGAAATCAG	55	Shangguan, Li, 2018

ПЦР проводилась в 13 мкл реакционной смеси, содержащей 10-кратный Taq-буфер (Евроген), 5 mM каждого dNTP, 5 mM прямого праймера, 5mM обратного праймера, 5 mM флуоресцентного красителя (Синтол), Taq ДНК- полимеразу (5000 ед, Евроген), 40-60 нг тотальной ДНК, деионизованную воду. Проведение ПЦР осуществлялось в лаборатории «Экология и эволюционная биология водных организмов» ИМО ДВФУ, а также на базе ЦКП «Приморский океанариум», ННЦМБ ДВО РАН.

Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация при 95 °С в течение 1 мин, далее для 35 циклов: денатурация при 95 °С – 30 сек, оптимальная температура отжига (табл. 2) – 30 сек, элонгация при 72 °С – 1 мин, финальная элонгация при 72 °С – 5 мин.

Продукты ПЦР визуализировали в 1.5% агарозном геле в трис-боратном электродном буфере (890 mM Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 890 mM борная кислота, 20 mM ЭДТА, pH 8.3.), содержащем бромид этидия (10 мг/мл). Пробы, в которых наблюдался избыток ДНК, разбавляли в 2 – 10 раз, после чего готовили смесь из ПЦР-продуктов, меченых разными флуоресцирующими красителями. ПЦР-смесь добавляли в смесь для генотипирования, содержащую формамид и размерный стандарт (S450, COrDIS), и затем подвергали электрофорезу на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) на базе Кафедры клеточной биологии и генетики ИМО ДВФУ. Длину фрагментов в полученных ПЦР-продуктах определяли с помощью программы GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, США).

2.4.2 Статистическая обработка данных микросателлитных локусов яДНК

Обнаружение ошибок генотипирования проводилось в программе MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al., 2004). Частоты нулевых аллелей, исходя из пропорций Харди-Вайнберга, были оценены и скорректированы в соответствии с методами, разработанными Брукфилдом (Brookfield, 1996). С целью проверки нейтральности микросателлитных локусов был проведен тест Эванса-Ваттерсона с использованием алгоритма Манли (Manly, 1985) для 10000 смоделированных образцов в программном пакете Popgene 1.31 (Yeh et al., 1997). Тест на нейтральность микросателлитов, основанный на полиномиальном распределении Дирихле, проводился в программе BayeScan 2.1 (Foll, Gaggiotti, 2008). С его помощью был получен предполагаемый α -коэффициент, указывающий на силу и направление отбора (положительные значения предполагают дизруптивный отбор, отрицательные значения - уравновешивающий или очищающий отбор), значение q для модели, коэффициент F_{st} , усредненный по выборкам. Конвертация данных из формата файла программы Genepop 4.7.0 (Rousset, 2008) в BayeScan проводилась с помощью программы PGDSpider 2.1.1.5 (Lischer, Excoffier, 2012).

Число аллелей на локус (N_a), число уникальных аллелей (U) и информационный индекс Шеннона (I) были рассчитаны в программе GenAIEx 6.5.1 (Peakall, Smouse, 2012). Аллельное богатство (A_r) подсчитано в программном пакете Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995); для данных была проведена коррекция на минимальный объем выборки (22 особи). Значения наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности были определены в программе Arlequin 3.5.2.1 (Excoffier, Lischer, 2010). Коэффициент инбридинга (F_{is}) получен в программе 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).

Для определения генетической структуры популяции используется показатель F_{st} , измеряющий величину генетической изменчивости на основе F-статистики Райта (Wright, 1965). Значение F_{st} , равное 0, указывает на отсутствие

дифференциации между субпопуляциями, тогда как значение 1 указывает на полную дифференциацию (Bird et al., 2017). F_{st} выше 0.15 можно считать значимым при дифференциации популяций (Frankham et al., 2002). Расчет F_{st} (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) проведен в программе FreeNA (Chapius, Estoup, 2007) с помощью метода коррекции ENA, который учитывает присутствие нулевых аллелей. Основываясь на островной модели, поток генов был косвенно выведен по формуле Райта (Wright, 1931): $1/4 (1-F_{st})/F_{st}$ в программе GenAlEx 6.5.1 (Peakall, Smouse, 2012). Стандартные генетические дистанции Нея (D_s ; Nei, 1972) были подсчитаны в GenAlEx 6.5.1. На основе D_s была построена UPGMA-дендрограмма в программе Populations 1.2.32 (Langella, 1999). Устойчивость топологии дерева оценивали с помощью бутстрэп-анализа (BS, Felsenstein, 1985) – 1000 повторов. Визуализация дерева проводилась в программе TreeViewX (версия 0.5.0; Page, 1996). Также в программе Populations 1.2.32 рассчитаны хорд-дистанции Кавалли-Сфорца и Эдвардса (D_{CE} ; Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) и бутстрэп-матрицы этих дистанций (по 1000 псевдореплик), на основании которых в PHYLIP 3.698 (Felsenstein, 1989; Felsenstein, 2005) построены NJ-деревья.

Определение генетической структуры *Apostichopus japonicus* проводилось на основе Байесовской кластеризации в программе STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000). Параметры анализа допускали возможность миграционных потоков между любыми выборками (функция «admixture»). Для выбора оптимального количества прогонов выполнялось их разное число с длиной прогона от 10000 до 250000, после проверки сводной статистики (значения α , F_{st} и функции правдоподобия) наиболее подходящая длина прогона (значение «burn-in») была определена в 100 000 с повторами 250 000 МСМС (метод Монте-Карло с цепями Маркова). Анализ оптимального числа генетических групп (K) от 1 до 5 для каждого K повторялся 20 раз. Суммарные гистограммы для каждого K визуализированы в программе CLUMPAK (Kopelman et al., 2015).

Проведено сравнение результатов Байесовской кластеризации с использованием параметров по умолчанию и с расширенными настройками в соответствии с рекомендациями (Wang, 2017; Janes et al., 2017). Так, в

расширенных настройках применялась модель LocPrior (Hubisz et al., 2009) для облегчения кластеризации с использованием мест выборки в качестве априорной информации. Данный метод используется для наборов данных с небольшим количеством маркеров, небольшим размером выборки или слабым сигналом о структуре. Информативность модели была проверена по значению r (информативность данных о месте сбора проб): $r \leq 1$ указывает на то, что места сбора выборок играют важную роль при кластеризации. В расширенных настройках было скорректировано значение параметра α (относительный уровень смешивания особей из разных популяций) с 1 до $1/K$, где K – предполагаемое число кластеров (в данной работе $K=5$). Дополнительно выбраны независимые α для каждой выборки, а также независимые частоты аллелей. Данные настройки применимы к выборкам разного размера и небольшому числу K (Wang, 2017), что подходит для изучаемых данных. В конечном итоге такое сравнение поможет получить более точные выводы о кластеризации выборок.

Оптимальное число генетических групп определяли показателем ΔK по методу Эванно (Evanno et al., 2005), а также с помощью метода, используемого в программе STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), основанного на логарифмическом правдоподобию апостериорных вероятностей $\ln P(K)$. Для сравнения результатов была применена альтернативная статистика с использованием максимумов и медиан средних (Puechmaile, 2016). Визуализация графиков осуществлялась в программе StructureSelector (Li, Liu, 2018).

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). В модели IAM каждая мутация случайным образом создает новую аллель (Maruyama, Fuerst, 1985), таким образом изменяя количество повторов. При пошаговой модели мутации (SMM) либо появляется 1 повторяющаяся единица, либо теряется. Если локусы развиваются в рамках строгой одноступенчатой модели

мутации, избыток и дефицит гетерозиготности могут возникать в зависимости от изменчивости локуса и времени, прошедшего с момента возникновения «бутылочного горлышка» (Chakraborty, Nei, 1977). IAM и SMM представляют собой две противоположные модели мутаций (Chakraborty, Jin, 1992), иногда игнорирующие свойства микросателлитных мутаций (Wu, Drummond, 2011). Ди Риензо с соавторами (Di Rienzo et al., 1998) представили двухфазную модель как улучшение модели SMM для исследований микросателлитов. Данная модель прогнозирует в основном одноэтапные мутации с небольшим процентом многоэтапных изменений. Дополнительно проведен анализ смещения распределения частот аллелей микросателлитных локусов – тест сдвига моды (Luikart et al., 1998). Расчет проведен с числом итераций 1000.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Анализ изменчивости мтДНК в выборках *Apostichopus japonicus*

При изучении изменчивости фрагмента гена *COI* мтДНК было обнаружено 16 гаплотипов (рис. 3) для всех выборок дальневосточного трепанга. Последовательности были депонированы в GenBank (номера OP077239-OP077254). Среднее значение гаплотипического разнообразия для всех выборок составило 0.86767 ± 0.01800 , нуклеотидного разнообразия - 0.00759 ± 0.00025 (табл. 3). Обнаруженное общее число полиморфных сайтов - 21, наименьшее – для б. Федорова (12), наибольшее – для зал. Посьета_2018 (18). Среднее число нуклеотидных различий варьировало от 3.83810 ± 2.00950 (б. Федорова) до 4.57333 ± 2.32447 (зал. Посьета_2015). Наибольшее число гаплотипов наблюдалось в выборках зал. Восток и зал. Посьета_2018 (по 11), наименьшее – в выборке м. Красный (6). Уникальные гаплотипы встречались в выборках зал. Восток и зал. Посьета разных годов.

Таблица 3 - Молекулярное разнообразие выборок *Apostichopus japonicus*, отобранных в зал. Петра Великого, на основе последовательности фрагмента гена *COI* мтДНК

Выборка	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>S</i>	Гаплотипы (абсолютная частота встречаемости)	<i>k</i> ±SD	<i>h</i> ±SD	<i>π</i> ±SD
Vos	29	11	17	H1 (1), H2 (4), H3 (1), H4 (4), H5 (1), H6 (3), H7 (9), H8 (1), H9 (2), H10 (2), H11 (1)	4.16749 ± 2.13323	0.86946 ± 0.04300	0.00752 ± 0.00054
Krs	20	6	13	H2 (4), H4 (2), H6 (4), H7 (8), H10 (1), H12 (1)	3.91053 ± 2.04637	0.78421 ± 0.06400	0.00706 ± 0.00061
Pos15	25	9	17	H4 (2), H5 (1), H6 (3), H7 (2), H10 (2),	4.57333 ± 2.32447	0.88000 ± 0.03900	0.00826 ± 0.00057

				H11 (7), H12 (4), H13 (3), H14 (1)			
Fed	21	7	12	H2 (4), H4 (1), H5 (2), H6 (1), H7 (9), H11 (2), H12 (2)	3.83810± 2.00950	0.78571± 0.07400	0.00693±0.00054
Pos18	22	11	18	H2 (2), H6 (1), H7 (5), H8 (1), H10 (2), H11 (5), H12 (2), H13 (1), H14 (1), H15 (1), H16 (1)	4.42857±2.27070	0.90043± 0.04100	0.00799± 0.00098
Общее	117	16	21	H1 (1), H2 (14), H3 (1), H4 (9), H5 (4), H6 (12), H7 (33), H8 (2), H9 (2), H10 (7), H11 (15), H12 (9), H13 (4), H14 (2), H15 (1), H16 (1)	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.

Попарные оценки F_{st} (табл. 4) продемонстрировали в большинстве своем отрицательные значения и были статистически незначимы ($P > 0.05$). P -дистанции (табл. 5), как и $K2p$ -дистанции (табл. 6), имели низкие величины, близкие друг к другу (от 0.7% до 0.8%).

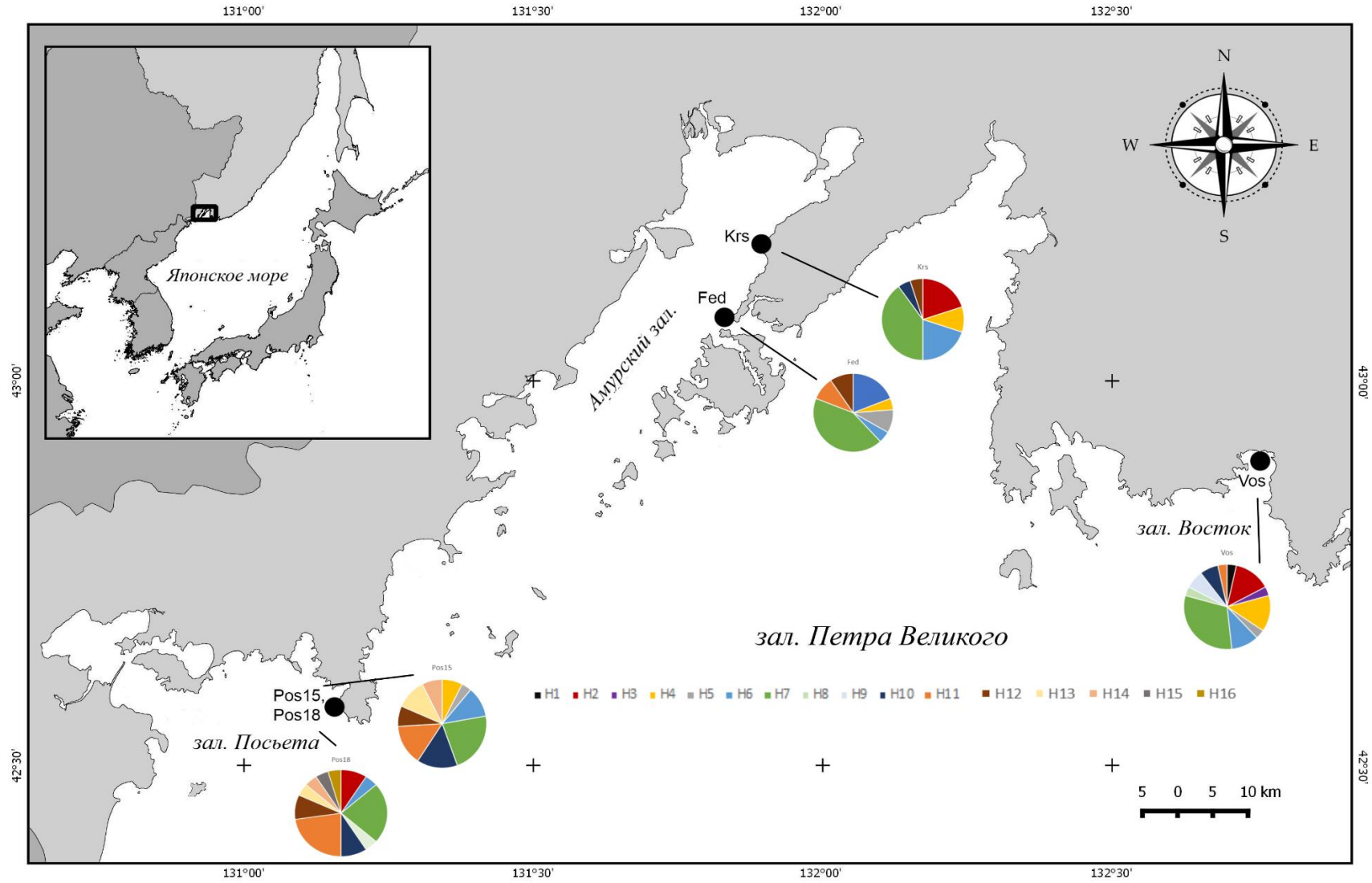


Рисунок 3 - Географическое распределение частот гаплотипов мтДНК в выборках *Apostichorus japonicus* (Ягодина, Брыков, 2023).

Таблица 4 - Тестирование уровня дифференциации выборок *Apostichopus japonicus*: значения F_{st} ниже диагонали, достоверность значений F_{st} – выше диагонали

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.88169	0.28096	0.70627	0.30294
Krs	-0.03007		0.19612	0.60410	0.19364
Pos15	0.00638	0.01670		0.17761	0.20315
Fed	-0.02081	-0.02146	0.02090		0.56321
Pos18	0.00430	0.02276	0.01637	-0.01642	

Таблица 5 - Тестирование уровня дифференциации выборок *Apostichopus japonicus*: значения p -дистанций расположены ниже диагонали, стандартная ошибка - выше диагонали

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.002092	0.002083	0.002070	0.002127
Krs	0.007080		0.002121	0.002105	0.002201
Pos15	0.007937	0.007794		0.002144	0.002213
Fed	0.007081	0.006846	0.007760		0.002080
Pos18	0.007789	0.007704	0.008261	0.007341	

Таблица 6 - Тестирование уровня дифференциации выборок *Apostichopus japonicus*: значения $K2p$ -дистанций расположены ниже диагонали, стандартная ошибка - выше диагонали

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.002212	0.002259	0.002193	0.002207
Krs	0.007153		0.002331	0.002228	0.002236
Pos15	0.007873	0.007787		0.002341	0.002219
Fed	0.008019	0.007873	0.008352		0.002269
Pos18	0.007153	0.006916	0.007420	0.007839	

Результаты анализа молекулярной изменчивости показали (табл. 7), что значительное разнообразие гаплотипов наблюдалось внутри выборок (99.93%), чем между ними (0.07%), т.е. различий между группами особей практически не наблюдалось. Индекс фиксации $F_{ST}=0.00070$ был статистически незначим ($P>0.05$). При изучении дифференциации между выборками дальневосточного трепанга был применен критерий χ^2 (табл. 8), для которого значения между выборками зал. Восток и зал. Посьета_2015, м. Красный и зал. Посьета_2015, зал. Посьета_2015 и б. Федорова оказались достоверны ($P < 0.05$). Определение потока генов между выборками *A. japonicus* (табл. 8) выявило его отсутствие между некоторыми выборками (между зал. Восток и м. Красный, зал. Восток и б. Федорова, м. Красный и б. Федорова, б. Федорова и зал. Посьета_2018).

Таблица 7 - Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) по частотам гаплотипов мтДНК в выборках *Apostichopus japonicus*

Уровень разнообразия	d.f.	Сумма квадратов	Компоненты дисперсии	Процент дисперсии	Индекс	Вероятность (P)
Между выборок	4	8.539	0.00147	0.07	0.00070	0.40186
Внутри выборок	112	235.256	2.10050	99.93		
Общее	116	243.795	2.10197			

Примечание. d.f. – число степеней свободы.

Таблица 8 - Тестирование уровня дифференциации с использованием критерия χ^2 и определение потока генов (Nm) между выборками *Apostichopus japonicus*: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Попарные сравнения выборок	Nm	χ^2	Вероятность (P)
Vos-Krs	0	7.812	0.7300
Vos-Pos15	81.44	26.47	0.0147*
Vos-Fed	0	11.481	0.4039
Vos-Pos18	126.28	19.89	0.1762
Krs-Pos15	27.88	21.587	0.0103**
Krs-Fed	0	7.506	0.3782
Krs-Pos18	21.14	15.766	0.1500
Pos15-Fed	22.53	19.364	0.0223*
Pos15-Pos18	29.84	12.144	0.4342
Fed-Pos18	0	13.079	0.3633

Для определения взаимоотношений гаплотипов мтДНК изучаемых выборок дальневосточного трепанга были получены деревья, построенные на основе p -дистанций (UPGMA-дерево, рис. 4) и $K2p$ -дистанций (NJ-дерево, рис. 5). В результате формировалось 2 кластера, положение гаплотипов на фенограммах не менялось за исключением гаплотипов Н4 и Н13.

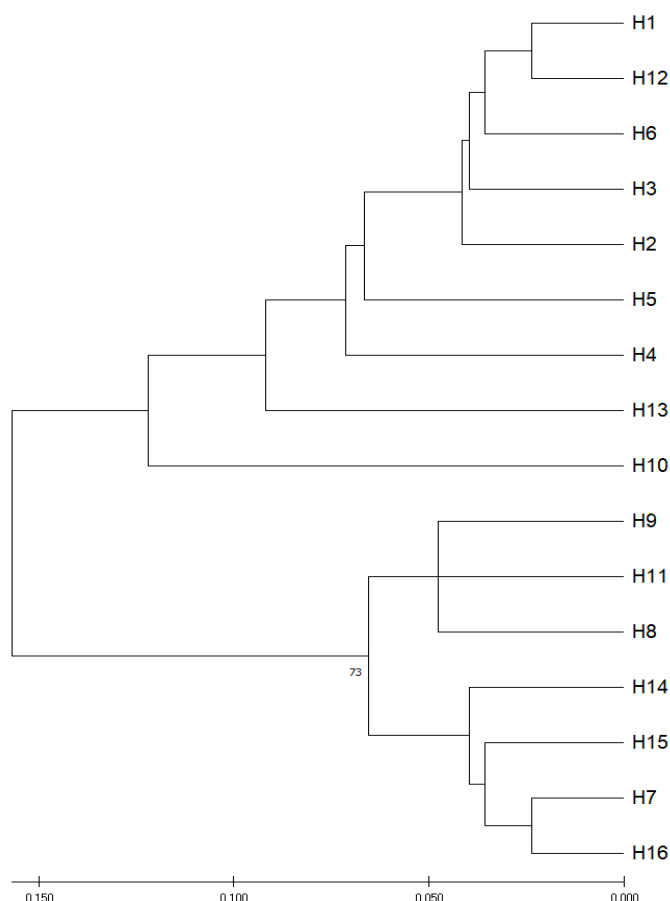


Рисунок 4 - UPGMA-дерево, построенное на основе p -дистанций для гаплотипов *Apostichopus japonicus*. Оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 псевдореплик) приведены только для тех точек ветвления, которые воспроизводятся более чем в 50% деревьев.

При исследовании взаимоотношений между гаплотипами изучаемых выборок *A. japonicus* была построена генеалогическая сеть гаплотипов с помощью MJ-метода (рис. 6). 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. Гаплотипы H4 и H13 расположены между двумя основными кластерами, поэтому можно указать на соответствие гаплотипической сети двум построенным фенограммам (рис. 4, рис. 5).

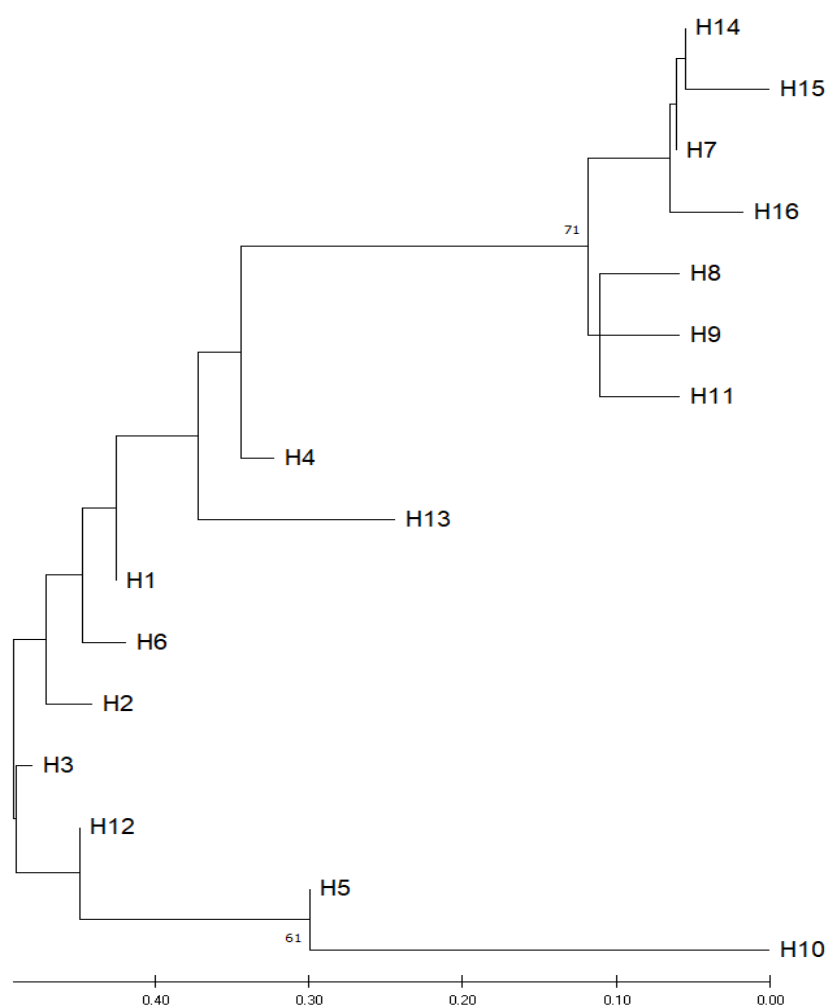


Рисунок 5 - NJ-дерево, построенное на основе K2p дистанций для гаплотипов *Apostichopus japonicus*. Оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 псевдореплик) приведены только для тех точек ветвления, которые воспроизводятся более чем в 50% деревьев.

Для построения медианной сети гаплотипов из генного банка (GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) были добавлены последовательности гаплотипов дальневосточного трепанга с побережья Санрику (Adachi et al., 2018, номера LC380752-LC380832). Частоты гаплотипов в данном случае не учтены. Результаты представлены на рисунке 7. Характерной особенностью данного генеалогического дерева является наличие большого количества альтернативных связей равной длины, которые возникают в результате обратных или параллельных мутаций, что приводит к образованию множественных замкнутых циклов. Число нуклеотидных замен между гаплотипами составляет не более трех, однако гаплотипы одной географической группы входят в разные структуры сети, генеалогические расстояния между которыми оказываются очень большими.

Тестирование нейтральности выборок *Apostichopus japonicus* (табл. 9), показало согласование значений D и F_s . Средние для всех выборок показатели D и F_s были отрицательными. Однако ни одна из представленных величин не была статистически значима ($P > 0.05$). В соответствии с моделью демографической экспансии (*demographic expansion*) для каждой выборки рассчитаны индекс неоднородности (r) и сумма квадратов отклонений (SSD). Полученные значения (табл. 9) были не достоверны, следовательно, не подтвердили гипотезу увеличения численности особей *Apostichopus japonicus* в исследуемом ареале.

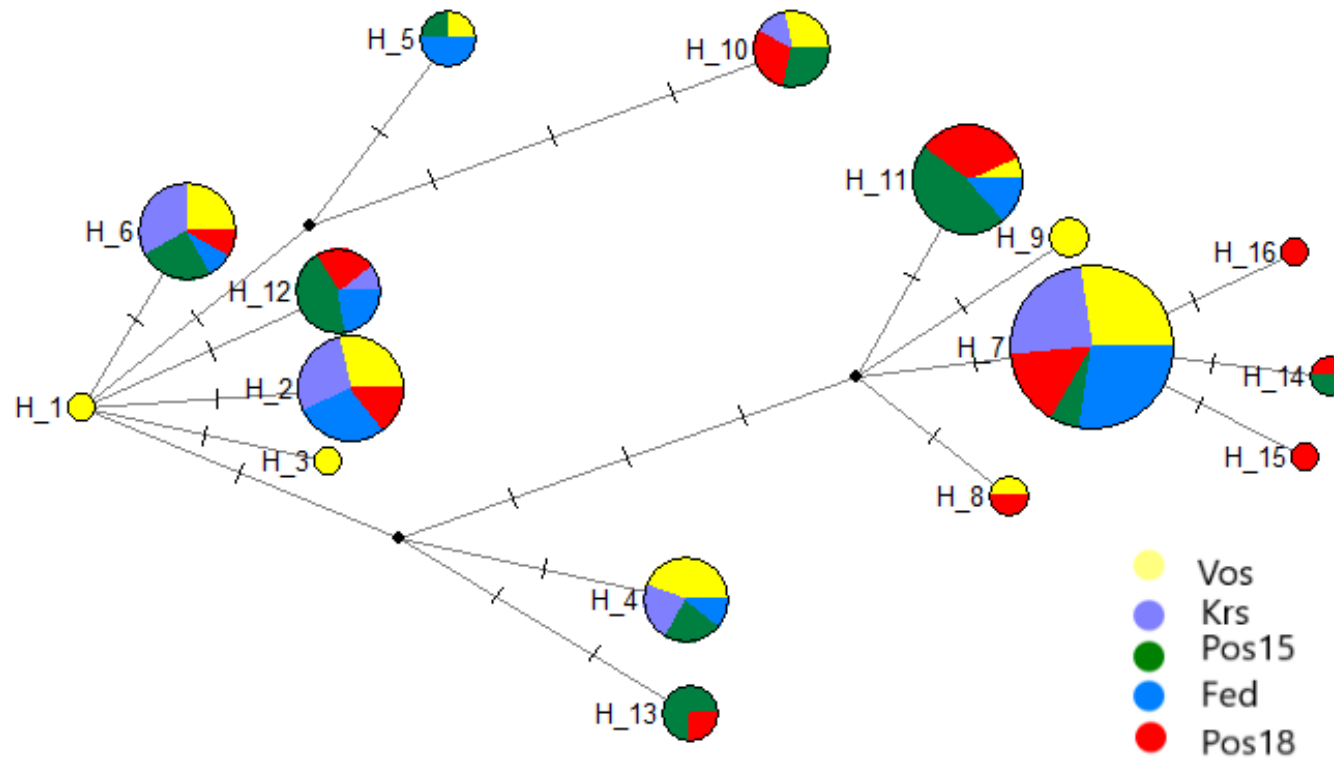


Рисунок 6 - Генеалогическая сеть (MJ - анализ) гаплотипов мтДНК *Apostichopus japonicus* исследуемых выборок. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален абсолютным частотам гаплотипов. Все мутации имеют равный вес, интервал поиска медианных векторов ε равен нулю (Ягодина, Брыков, 2023).

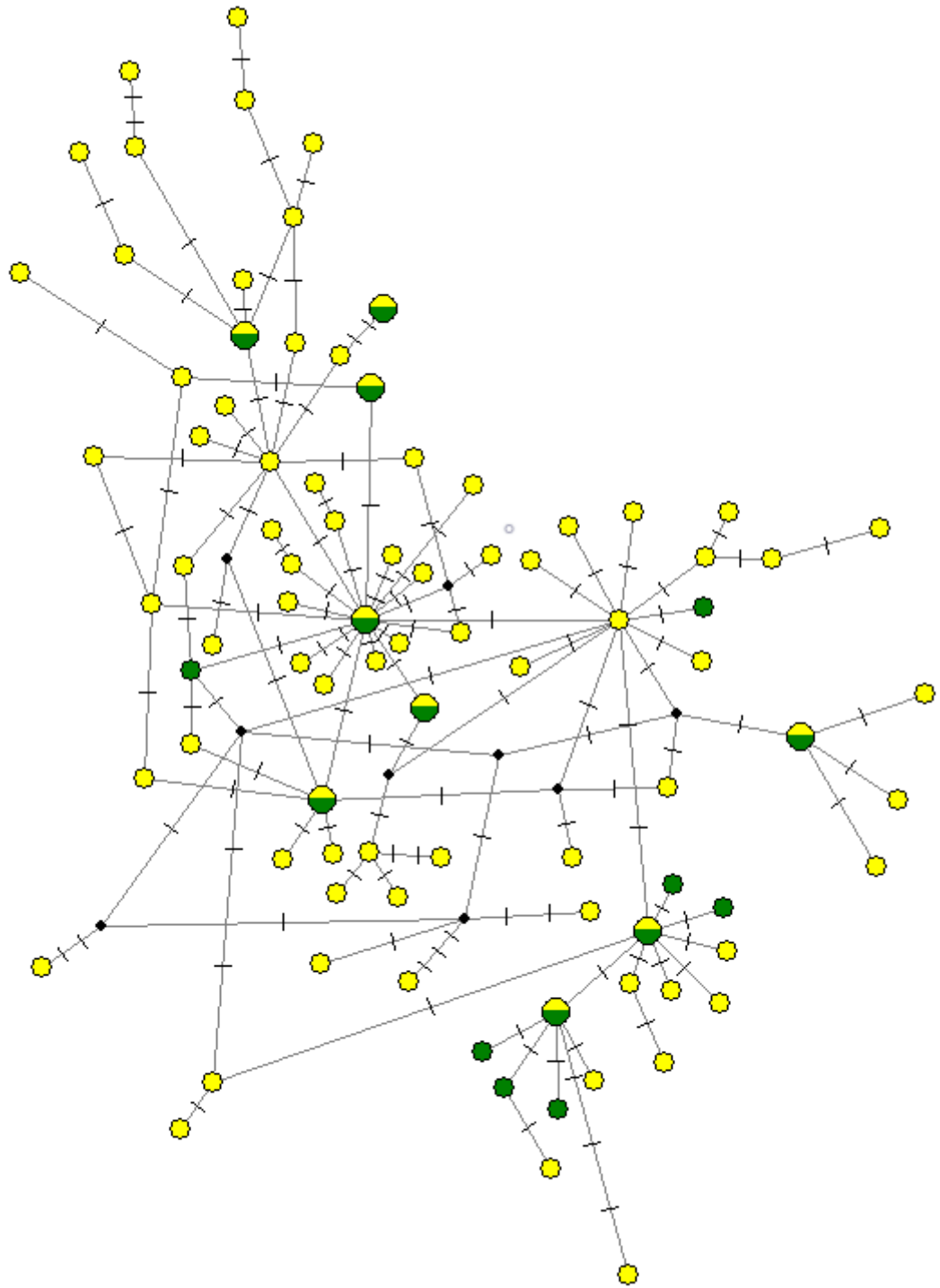


Рисунок 7 - Генеалогическая сеть (MJ - анализ) гаплотипов мтДНК *Apostichopus japonicus* в исследуемых выборках и с Тихоокеанского побережья Японии. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; гаплотипы побережья Японии указаны желтым цветом, гаплотипы изучаемых выборок – зеленым цветом. Все мутации имеют равный вес, интервал поиска медианных векторов ϵ равен нулю.

Таблица 9 - Тесты нейтральности мтДНК Таджимы (D) и Фу (F_s), сумма квадратов отклонений (SSD) и индекс неровности (r) в соответствии с моделью демографической экспансии для выборок *Apostichopus japonicus*. Для каждого показателя приведена вероятность (P): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Выборка	D	P	F_s	P	SSD	P	r	P
Vos	-0.12838	0.46430	-1.05419	0.34590	0.06095	0.00990***	0.14884	0.00960**
Kts	0.24374	0.62930	1.76809	0.81930	0.12822	0.00470**	0.31155	0.00510**
Pos15	0.05617	0.54990	0.31968	0.60640	0.05227	0.00670**	0.13182	0.00620**
Fed	0.53424	0.73670	0.88963	0.69770	0.10554	0.00360**	0.26025	0.01220**
Pos18	-0.37936	0.37180	-1.78021	0.21530	0.06314	0.04420*	0.15714	0.03100*
Общее	0.06528	0.55040	0.02860	0.53692	0.06824	0.00170**	0.16784	0.00080***

Изучение распределения числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК продемонстрировало мультимодальность и неровность как для совокупности (рис. 8), так и для отдельных выборок (рис. 9).

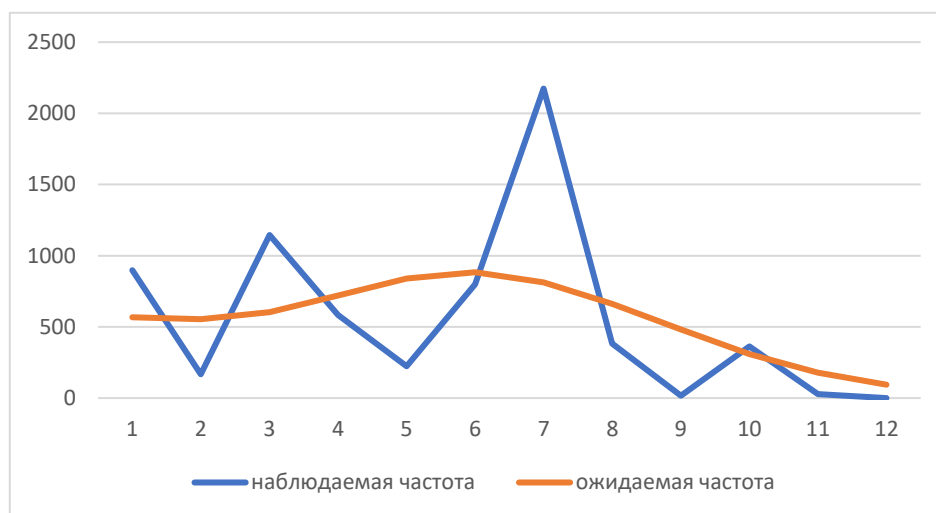


Рисунок 8 - Распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Apostichopus japonicus* для всех выборок. Ось x показывает количество парных различий, ось y показывает частоту парных сравнений.

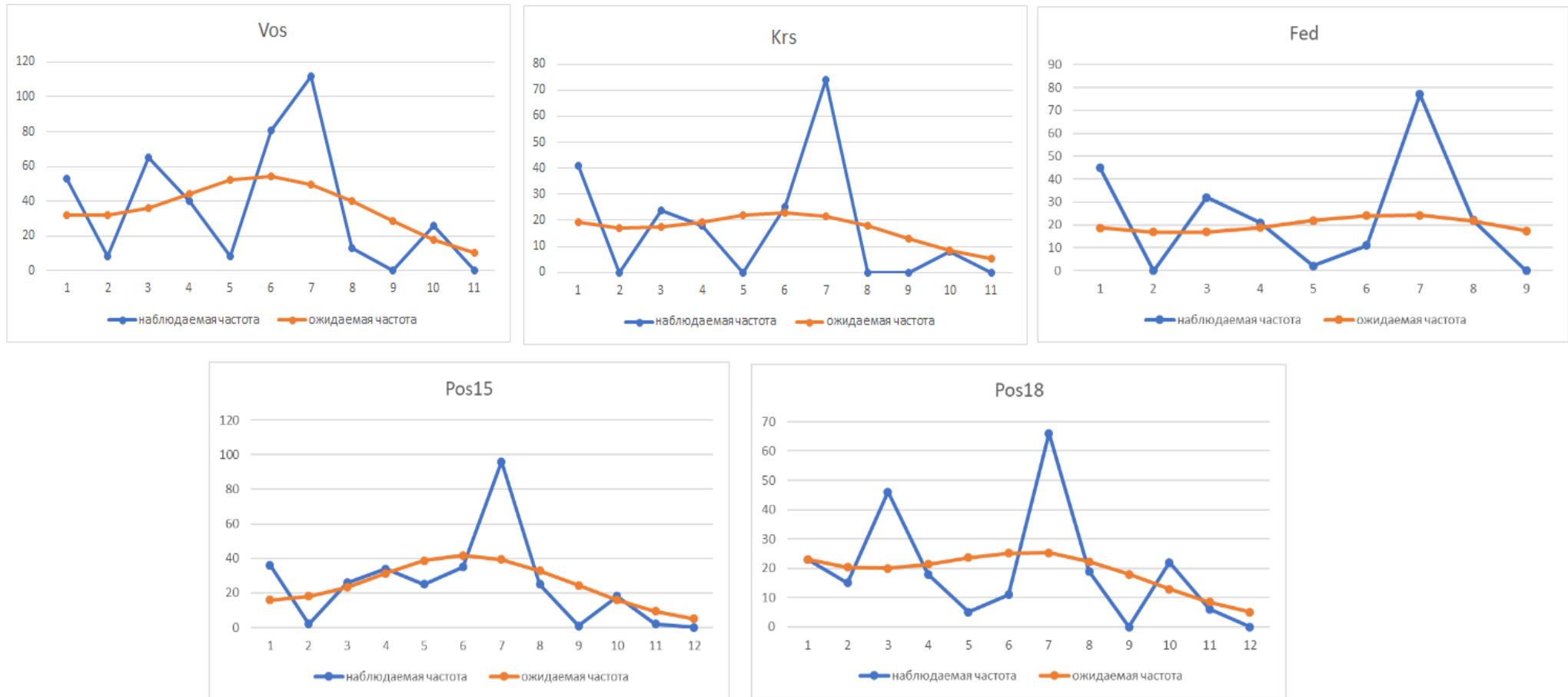


Рисунок 9 - Распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Apostichopus japonicus* для каждой выборки. Ось x показывает количество парных различий, ось y показывает частоту парных сравнений (Ягодина, Брыков, 2023).

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:

- **вариант 1:** гаплогруппа 1 (H1, H2, H3, H5, H6, H10, H12), гаплогруппа 2 (H4, H7, H8, H9, H11, H13, H14, H15, H16);

- **вариант 2:** гаплогруппа 1 (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H10, H12, H13), гаплогруппа 2 (H7, H8, H9, H11, H14, H15, H16).

Анализ молекулярной дисперсии для двух тестируемых вариантов выявил общую тенденцию распределения изменчивости: процент изменчивости между двумя гаплогруппами выше, чем внутри них (табл. 10). Индексы F_{ST} в обоих случаях были значимы ($P < 0.001$). Величина потока генов для варианта 1 составила 0.17, для варианта 2 – 0.23.

Таблица 10 - Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) по частотам гаплотипов мтДНК в гаплогруппах *Apostichopus japonicus*

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

Примечание. d.f. – число степеней свободы; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Коалесцентное моделирование показало, что значения нуклеотидной изменчивости для гаплогрупп и для генеральной совокупности выборок расположены в границах доверительного интервала (табл. 11). Примечательно, что при варианте 2 группировки гаплотипов нуклеотидное разнообразие между гаплогруппами отличалось более, чем в 2 раза.

Таблица 11 - Показатели нуклеотидного разнообразия мтДНК для разных вариантов группировки гаплотипов и совокупности выборок *A. japonicus* со значением коалесцентного моделирования

Группа	$\pi \pm SD$	* π (CI)
Вариант 1:		
Гаплогруппа 1	0.00440 \pm 0.00041	0.004 (0.001-0.007)
Гаплогруппа 2	0.00443 \pm 0.00049	0.005 (0.001-0.010)
Вариант 2:		
Гаплогруппа 1	0.00516 \pm 0.00038	0.005 (0.002-0.009)
Гаплогруппа 2	0.00205 \pm 0.00022	0.003 (0.001-0.006)
Совокупность выборок	0.00759 \pm 0.00025	0.007 (0.003-0.013)

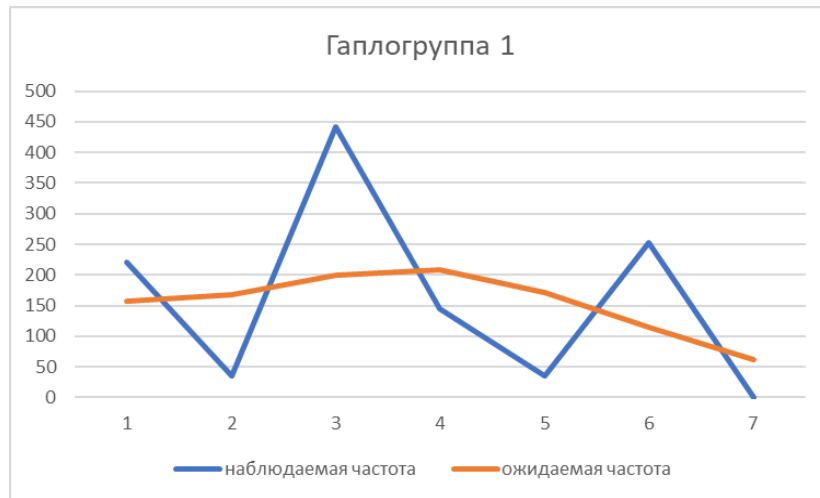
Примечание. π – нуклеотидное разнообразие, SD – стандартное отклонение, * π – нуклеотидное разнообразие при коалесцентном моделировании ($P < 0.001$), CI – доверительный интервал ($P < 0.001$).

Тестирование нейтральности мтДНК (табл. 12) не выявило статистически значимых различий ($P > 0.05$), следовательно, нулевая гипотеза о неравновесии гаплогрупп не отвергается. Увеличение численности особей изучаемых гаплогрупп также не подтвердилось (табл. 12), так как все значения индекса неоднородности (r) и суммы квадратов отклонений (SSD) были недостоверны ($P < 0.01$). Анализ распределения числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) (рис. 10) выявил мультимодальность, как и при подсчете для отдельных выборок.

Таблица 12 - Тесты нейтральности мтДНК Таджимы (D) и F_s (F_s), сумма квадратов отклонений (SSD) и индекс неровности (r) в соответствии в моделью демографической экспансии для гаплогрупп *Apostichopus japonicus*. Для каждого показателя приведена вероятность (P): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

	D	P	F_s	P	SSD	P	r	P
Вариант 1:								
Гаплогруппа 1	0.57021	0.74550	0.96920	0.70410	0.09389	0.00240**	0.32110	0.00080***
Гаплогруппа 2	-0.04884	0.55410	0.12303	0.56950	0.07341	0.08980	0.23276	0.05410
Вариант 2:								
Гаплогруппа 1	0.08591	0.58520	0.52161	0.63950	0.03105	0.00090***	0.10706	0.00150**
Гаплогруппа 2	-0.65607	0.28890	-1.39696	0.24490	0.11053	0.05210	0.40575	0.03650

Вариант 1



Вариант 2

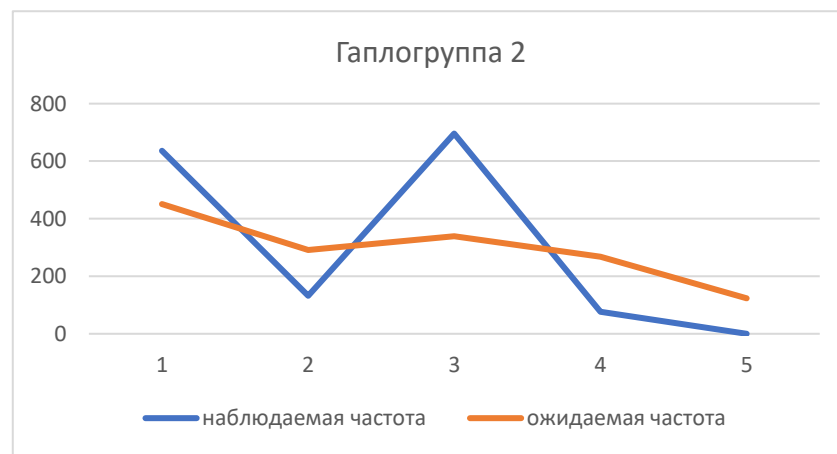
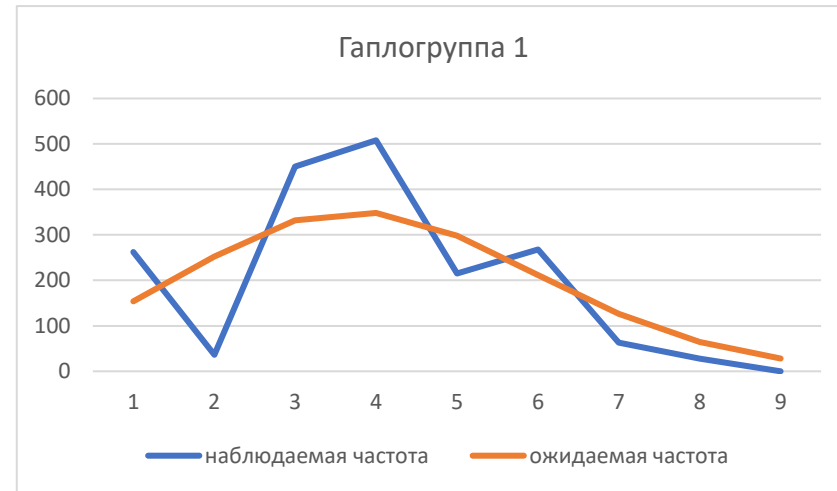


Рисунок 10 - Распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Apostichopus japonicus* внутри габлогрупп. Ось *x* показывает количество парных различий, ось *y* показывает частоту парных сравнений.

3.2 Изучение генетического разнообразия и дифференциации выборки *Apostichopus japonicus* по микросателлитным локусам яДНК

В результате изучения генетического разнообразия *Apostichopus japonicus* было обнаружено 108 аллелей по 10 микросателлитным локусам. Самыми высокополиморфными оказались локусы Psj1828 и Psj2409 с 14 аллелями, минимальное число аллелей, равное 5, наблюдалось в локусе AJ10675. Среднее число аллелей на локус составило 10.8. В каждой выборке найдены уникальные аллели: минимальное число - 1 - для выборки зал. Посъета_2015, максимальное - 7 – для выборки б. Федорова. Всего 24 уникальных аллеля присутствуют во всех выборках.

Неравновесие по сцеплению при 45 парных сравнениях локусов (табл. 13) для всех выборок было выявлено между локусами AJ20333 и AJ13361 ($P < 0.001$).

Таблица 13 - Тестирование неравновесия по сцеплению пар микросателлитных локусов для выборок *Apostichopus japonicus*. Для каждой пары указана вероятность (P): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Пара локусов		P	Пара локусов		P
AJ20333	AJ10675	0.395390	AJ13361	Psj2464	0.293400
AJ20333	AJ13361	0.000254***	PS205	Psj2464	0.959269
AJ10675	AJ13361	0.059577	Psj1828	Psj2464	0.406838
AJ20333	PS205	0.761149	Psj2889	Psj2464	0.617297
AJ10675	PS205	0.538520	Psj2409	Psj2464	0.332962
AJ13361	PS205	0.620868	AJ20333	FCS9	0.362794
AJ20333	Psj1828	0.509694	AJ10675	FCS9	0.095050
AJ10675	Psj1828	0.187657	AJ13361	FCS9	0.282154
AJ13361	Psj1828	0.908823	PS205	FCS9	0.734328
PS205	Psj1828	0.480527	Psj1828	FCS9	0.062871
AJ20333	Psj2889	0.845689	Psj2889	FCS9	0.256172
AJ10675	Psj2889	0.916127	Psj2409	FCS9	0.686172
AJ13361	Psj2889	0.081031	Psj2464	FCS9	0.287887
PS205	Psj2889	0.931768	AJ20333	3S16	0.812414
Psj1828	Psj2889	0.648310	AJ10675	3S16	0.126527
AJ20333	Psj2409	0.600624	AJ13361	3S16	0.111536
AJ10675	Psj2409	0.402547	PS205	3S16	0.182713
AJ13361	Psj2409	0.836486	Psj1828	3S16	0.689596

PS205	Psj2409	0.222175	Psj2889	3S16	0.724583
Psj1828	Psj2409	0.468116	Psj2409	3S16	0.385750
Psj2889	Psj2409	0.239010	Psj2464	3S16	0.355169
AJ20333	Psj2464	0.483420	FCS9	3S16	0.736083
AJ10675	Psj2464	0.878575			

Результаты тестов на нейтральность для всех локусов по всем выборкам представлены в таблицах 14 и 15. По тесту Эванса-Ваттерсона (табл. 14) большинство локусов были нейтральны и не связаны с каким-либо признаком, так как значения наблюдаемой гомозиготности (Obs. F) расположены в пределах верхнего и нижнего 95% доверительного интервала. Значение F находилось за пределом доверительного интервала в локусе AJ10675.

Таблица 14 - Тест Эванса-Ваттерсона на нейтральность десяти микросателлитных локусов *Apostichopus japonicus*

Локус	Obs. F	SE	L95*	U95*
AJ20333	0.2959	0.0093	0.1400	0.5186
AJ10675	0.2821	0.0337	0.2840	0.9285
AJ13361	0.4040	0.0294	0.2544	0.8764
PS205	0.3036	0.0118	0.1512	0.5729
Psj1828	0.2422	0.0093	0.1307	0.5148
Psj2889	0.1646	0.0119	0.1645	0.5802
Psj2409	0.2740	0.0089	0.1305	0.4829
Psj2464	0.2497	0.0109	0.1489	0.5532
FCS9	0.2438	0.0183	0.1824	0.7176
3S16	0.1551	0.0113	0.1511	0.5668

Примечание. Obs. F – наблюдаемая гомозиготность, SE – стандартная ошибка среднего, L95 – нижняя граница доверительного интервала 95%, U95 – верхняя граница доверительного интервала 95%.

При проведении теста на нейтральность в программе BayeScan (табл. 15) четыре микросателлитных локуса демонстрировали возможное отсутствие нейтральности, для них показатель отклонения от модели нейтральности (q) был значим ($q < 0.01$): AJ10675, PS205, Psj2889, Psj2409. α -коэффициент имел отрицательные величины для этих локусов, за исключением AJ10675.

Таблица 15 - Тест на нейтральность десяти микросателлитных локусов *Apostichopus japonicus*, выполненный в программе BayeScan

Локус	F_{st}	α	q
AJ20333	0.085	0.003	0.477
AJ10675	0.343	1.754	0.000***
AJ13361	0.107	0.206	0.172
PS205	0.022	-1.525	0.001***
Psj1828	0.046	-0.771	0.055
Psj2889	0.013	-2.076	0.003***
Psj2409	0.023	-1.461	0.003**
Psj2464	0.084	-0.015	0.356
FCS9	0.084	-0.006	0.423
3S16	0.079	-0.086	0.271

Примечание. F_{st} - коэффициент F_{st} , усредненный по выборкам; α - альфа-коэффициент, указывающий на силу и направление отбора; q – значение отклонения от модели нейтральности, * $q < 0.05$, ** $q < 0.01$, *** $q < 0.001$

Результаты анализа генетического разнообразия дальневосточного трепанга по 10 микросателлитным локусам представлены в таблице 16. Информационный индекс Шеннона в среднем для каждой выборки был выше 1. Наибольшее значение аллельного богатства по всем локусам составило 7.051 ± 0.630 для выборки из зал. Восток; наименьшее – 5.957 ± 0.666 для выборки м. Красный. Средняя H_o для каждой выборки варьировала от 0.478 ± 0.047 (зал. Посьета_2018) до 0.528 ± 0.058 (зал. Восток); средняя H_e – от 0.650 ± 0.054 (зал. Посьета_2015) до 0.732 ± 0.037 (б. Федорова). Коэффициент инбридинга в среднем для каждой выборки был выше нуля.

Все выборки отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга ($P < 0.05$) по большинству локусов (табл. 16). Не было найдено ни одного локуса, для которого во всех выборках было соблюдено равновесие Харди-Вайнберга. Для группы особей м. Красный отклонения наблюдались для 5 из 10 локусов; для зал. Посьета_2015 – 9 из 10 локусов. Все отклоняющиеся от равновесия локусы указывали на дефицит гетерозигот.

Таблица 16 - Оценки генетического разнообразия по десяти микросателлитным локусам для пяти выборок

Apostichopus japonicus

Выборка	Параметр/ Локус	AJ20333	AJ10675	AJ13361	PS205	Psj1828	Psj2889	Psj2409	Psj2464	FCS9	3S16	Среднее±SE
Vos (43)	<i>Na</i>	8	5	3	9	9	11	11	11	7	9	8.300±0.844
	<i>I</i>	1.476	1.380	0.769	1.533	1.643	2.007	1.837	1.502	1.641	1.961	1.575±0.111
	<i>Ar</i>	6.281	4.960	2.985	7.268	7.760	9.249	9.341	7.943	6.226	8.501	7.051±0.630
	<i>U</i>	1	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0.600±0.306
	<i>Ho</i>	0.333	0.500	0.195	0.732	0.674	0.762	0.475	0.583	0.625	0.400	0.528±0.058
	<i>He</i>	0.721	0.717	0.452	0.704	0.737	0.845	0.785	0.694	0.792	0.844	0.729±0.035
	<i>F_{is}</i>	0.540	0.306	0.571	-0.040	0.085	0.099	0.398	0.161	0.213	0.529	0.286±0.068
	<i>P</i>	0.000***	0.000***	0.000***	0.067	0.079	0.075	0.000***	0.001***	0.001***	0.000***	
Krs (22)	<i>Na</i>	4	3	4	8	8	10	6	5	6	6	6.000±0.683
	<i>I</i>	1.012	0.861	1.019	1.251	1.806	1.821	1.256	1.442	1.124	1.640	1.323±0.108
	<i>Ar</i>	4.000	3.000	3.952	7.808	8.000	9.807	6.000	5.000	6.000	6.000	5.957±0.666
	<i>U</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0.500±0.224
	<i>Ho</i>	0.500	0.409	0.333	0.476	0.350	0.762	0.600	0.400	0.550	0.650	0.503±0.044
	<i>He</i>	0.538	0.542	0.603	0.570	0.819	0.798	0.664	0.753	0.585	0.813	0.668±0.037
	<i>F_{is}</i>	0.072	0.250	0.453	0.168	0.579	0.046	0.099	0.475	0.061	0.205	0.241±0.061
	<i>P</i>	0.072	0.031*	0.002**	0.296	0.000***	0.923	0.430	0.002**	0.584	0.036*	
Pos15 (39)	<i>Na</i>	7	3	3	7	7	9	8	5	8	9	6.600±0.702
	<i>I</i>	1.211	0.655	0.586	1.437	1.631	1.966	1.379	0.991	1.631	1.820	1.331±0.148
	<i>Ar</i>	5.427	2.526	2.889	6.286	6.868	8.6	6.07	4.015	7.118	7.629	5.743±0.640
	<i>U</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.100±0.100
	<i>Ho</i>	0.590	0.342	0.077	0.538	0.538	0.694	0.513	0.436	0.500	0.667	0.490±0.056
	<i>He</i>	0.611	0.424	0.327	0.686	0.754	0.849	0.697	0.565	0.767	0.820	0.650±0.054
	<i>F_{is}</i>	0.035	0.196	0.767	0.168	0.288	0.185	0.267	0.231	0.351	0.190	0.268±0.061
	<i>P</i>	0.042*	0.136	0.000***	0.005**	0.003**	0.009**	0.005**	0.031*	0.000***	0.020*	

Продолжение таблицы 16

Fed (29)	<i>Na</i>	8	2	5	8	7	9	9	8	7	9	7.200±0.696
	<i>I</i>	1.596	0.650	1.161	1.547	1.614	1.870	1.672	1.764	1.655	1.809	1.534±0.116
	<i>Ar</i>	7.596	2	4.947	7.065	6.48	8.402	8.276	7.346	6.824	8.333	6.727±0.620
	<i>U</i>	1	0	1	1	1	0	2	0	0	1	0.700±0.213
	<i>Ho</i>	0.370	0.542	0.379	0.793	0.556	0.704	0.444	0.429	0.571	0.458	0.525±0.044
	<i>He</i>	0.734	0.467	0.594	0.721	0.782	0.828	0.767	0.821	0.786	0.818	0.732±0.037
	<i>F_{is}</i>	0.500	-0.163	0.366	-0.103	0.294	0.185	0.425	0.482	0.276	0.445	0.271±0.074
<i>P</i>	0.000***	0.656	0.005**	0.394	0.004**	0.019*	0.001***	0.000***	0.001***	0.000***		
Pos18 (26)	<i>Na</i>	7	4	4	8	8	8	7	8	4	7	6.500±0.563
	<i>I</i>	1.325	0.849	0.972	1.658	1.570	1.865	1.324	1.800	0.914	1.772	1.405±0.122
	<i>Ar</i>	6.399	3.83	3.927	7.562	7.699	7.808	6.306	7.902	3.759	6.972	6.216±0.547
	<i>U</i>	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0.500±0.269
	<i>Ho</i>	0.600	0.333	0.200	0.680	0.308	0.542	0.500	0.500	0.577	0.542	0.478±0.047
	<i>He</i>	0.645	0.481	0.585	0.766	0.704	0.837	0.646	0.812	0.544	0.823	0.684±0.039
	<i>F_{is}</i>	0.071	0.311	0.663	0.114	0.568	0.358	0.230	0.390	-0.061	0.346	0.299±0.070
<i>P</i>	0.101	0.009**	0.000***	0.048*	0.000***	0.001***	0.034*	0.000***	0.783	0.019**		
Среднее (все выборки) ±SE	<i>Na</i>	7±0.735	3±0.510	4±0.374	8±0.316	8±0.374	9±0.510	8±0.860	7±1.122	6±0.678	8±0.632	6.920±0.322
	<i>I</i>	1.324±0.102	0.879±0.133	0.901±0.101	1.485±0.068	1.653±0.040	1.906±0.035	1.494±0.111	1.500±0.145	1.393±0.156	1.800±0.051	1.434±0.054
	<i>Ar</i>	5.941±0.596	3.263±0.520	3.740±0.376	7.198±0.261	7.361±0.292	8.773±0.346	7.199±0.680	6.441±0.812	5.985±0.592	7.487±0.460	6.339±0.540
	<i>U</i>	0.800±0.374	0±0.000	0.400±0.245	0.400±0.245	1.000±0.447	0.200±0.200	0.600±0.400	0.600±0.600	0.200±0.200	0.600±0.245	0.500±0.095
	<i>Ho</i>	0.479±0.055	0.425±0.042	0.237±0.054	0.644±0.059	0.485±0.068	0.693±0.040	0.506±0.026	0.470±0.033	0.565±0.020	0.543±0.052	0.505±0.022
	<i>He</i>	0.650±0.036	0.526±0.051	0.512±0.054	0.689±0.033	0.759±0.020	0.831±0.009	0.712±0.028	0.729±0.047	0.695±0.054	0.824±0.005	0.693±0.018
<i>F_{is}</i>	0.244±0.113	0.180±0.088	0.564±0.072	0.062±0.056	0.363±0.094	0.174±0.053	0.284±0.059	0.348±0.065	0.168±0.075	0.343±0.066	0.273±0.045	

Примечание. *Na* – число аллелей на локус, *I* – информационный индекс Шеннона, *Ar* – аллельное богатство, *U* – число уникальных аллелей, *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность, *He* – ожидаемая гетерозиготность, *F_{is}* – коэффициент инбридинга, *P* – значение отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, SE – стандартная ошибка среднего.

При тестировании уровня дифференциации выборок значения F_{st} (табл. 17) варьировали от 0.014 (между зал. Посьета_2018 и м. Красный) до 0.103 (между б. Федорова и м. Красный). Попарное сравнение групп особей, собранных в зал. Посьета в разные годы, демонстрирует значение 0.050, что больше, чем между зал. Посьета_2018 и м. Красный (0.014) и между зал. Посьета_2015 и м. Красный (0.035). Вероятностный тест показал достоверные значения F_{st} для всех пар сравнений ($P < 0.05$), за исключением пары зал. Восток - зал. Посьета_2018.

Таблица 17 - Тестирование уровня дифференциации выборок *Apostichopus japonicus*: значения F_{st} ниже диагонали, достоверность значений F_{st} – выше диагонали (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.000***	0.000***	0.000***	0.076
Krs	0.069		0.000***	0.000***	0.001***
Pos15	0.098	0.035		0.044*	0.002**
Fed	0.067	0.103	0.098		0.001***
Pos18	0.081	0.014	0.050	0.095	

Показатели стандартных генетических дистанций Нея и хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (табл. 18) продемонстрировали сходные результаты: наименьший показатель - (0.091) между зал. Посьета_2018 и м. Красный (0.091 и 0.266, соответственно), наибольший – между б. Федорова и м. Красный (0.382 и 0.411, соответственно). Косвенное определение потока генов (Nm) между выборками дальневосточного трепанга продемонстрировало значения от 2.412 между выборками зал. Восток и зал. Посьета_2015 до 19.693 между выборками м. Красный и зал. Посьета_2018 (табл. 19).

Таблица 18 - Значения стандартных генетических дистанций Нея (под диагональю) и хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (над диагональю) между выборками *Apostichopus japonicus*

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.339	0.316	0.329	0.341
Krs	0.236		0.273	0.411	0.266
Pos15	0.304	0.118		0.367	0.282
Fed	0.272	0.382	0.332		0.399
Pos18	0.297	0.091	0.155	0.369	

Таблица 19 - Оценка потока генов (Nm) между выборками *Apostichopus japonicus*

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed
Vos				
Krs	3.962			
Pos15	2.412	7.172		
Fed	4.132	2.669	2.599	
Pos18	3.307	19.693	4.698	2.832

На основе анализа фенетических отношений выборок *A. japonicus* продемонстрирована кластеризация выборок: выборки зал. Восток и б. Федорова формируют один кластер, м. Красный, выборки из зал. Посъета – второй кластер (UPGMA дендрограмма, рис. 11А); NJ-дерево показало разделение выборок зал. Восток и б. Федорова (BS=81%), выборка зал. Посъета_2015 представлена обособленно от других (рис. 11Б).

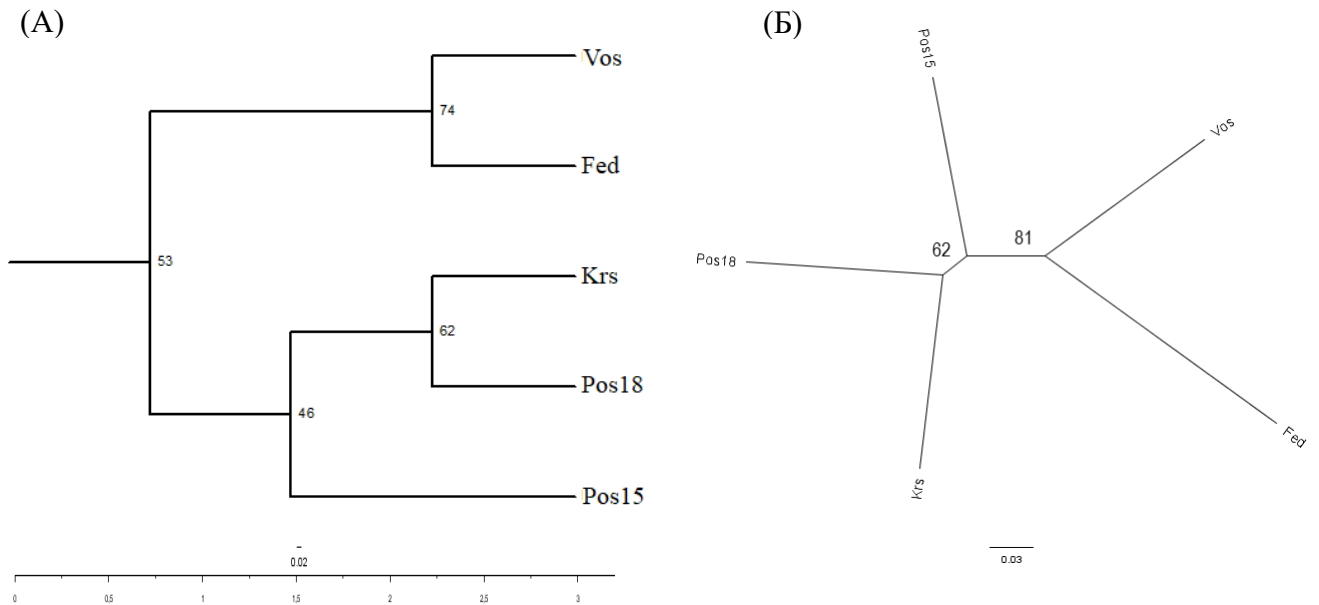


Рисунок 11 - Фенетические отношения выборок *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов яДНК. А – UPGMA- дендрограмма, построенная методом с использованием стандартных дистанций Нея. Б - NJ-дендрограмма, построенная на основе хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса.

Анализ на основе Байесовской кластеризации (STRUCTURE) проведен с использованием стандартных и расширенных вариантов настроек (рис. 12). Выборки зал. Восток и б. Федорова при $K=2$ обособлялись от м. Красный и выборок зал. Посъета (при использовании стандартных настроек слабее, чем с расширенными), при $K=3$ б. Федорова и зал. Восток разделяются на отдельные кластеры, причем б. Федорова отличается от других выборок сильнее, чем зал. Восток. С увеличением числа кластеров отделение этих выборок ослабляется, выборки зал. Посъета и м. Красный не кластеризуются обособленно. При использовании расширенных настроек при числе кластеров больше трех обособления не происходит, выборка б. Федорова также отделена от других, выборка зал. Восток менее гетерогенна, оставшиеся выборки представляют единый кластер.

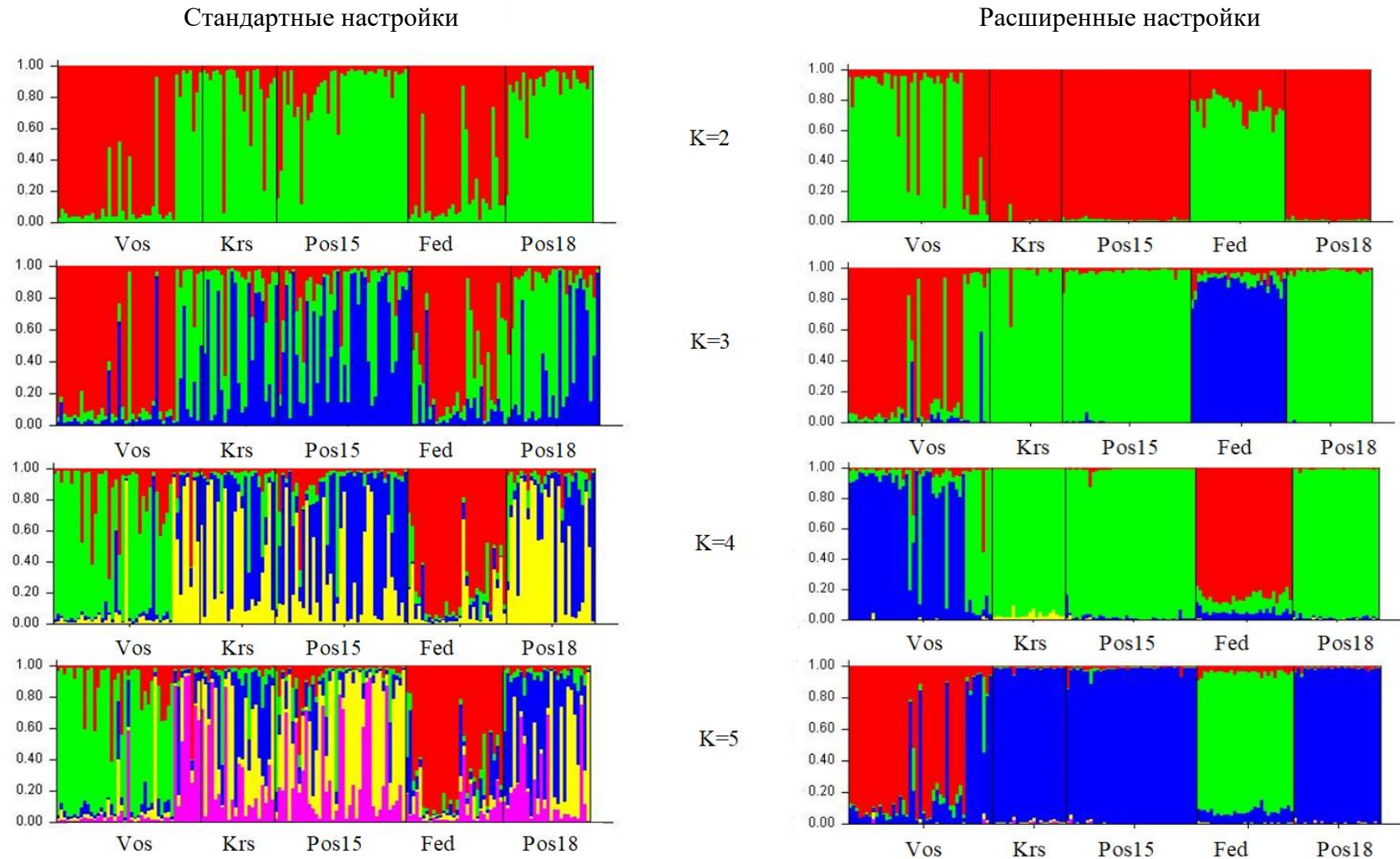


Рисунок 12 - Структура распределения генотипов в выборках *Apostichopus japonicus* при значениях K от 2 до 5. Каждая особь представлена одной вертикальной линией, разбитой на K цветных сегментов, длина которых пропорциональна каждому из K предполагаемых кластеров. По горизонтали указаны predeterminedные выборки.

На основе данных кластеризации с помощью метода Эванно были определены показатели ΔK (рис. 13А). Оптимальное число кластеров на основе ΔK наблюдалось при $K=4$ со стандартными настройками и при $K=3$ с расширенными. Наибольшее среднее значение логарифмического правдоподобия апостериорных вероятностей обнаружено при $K=5$ для обеих моделей (рис. 13Б).

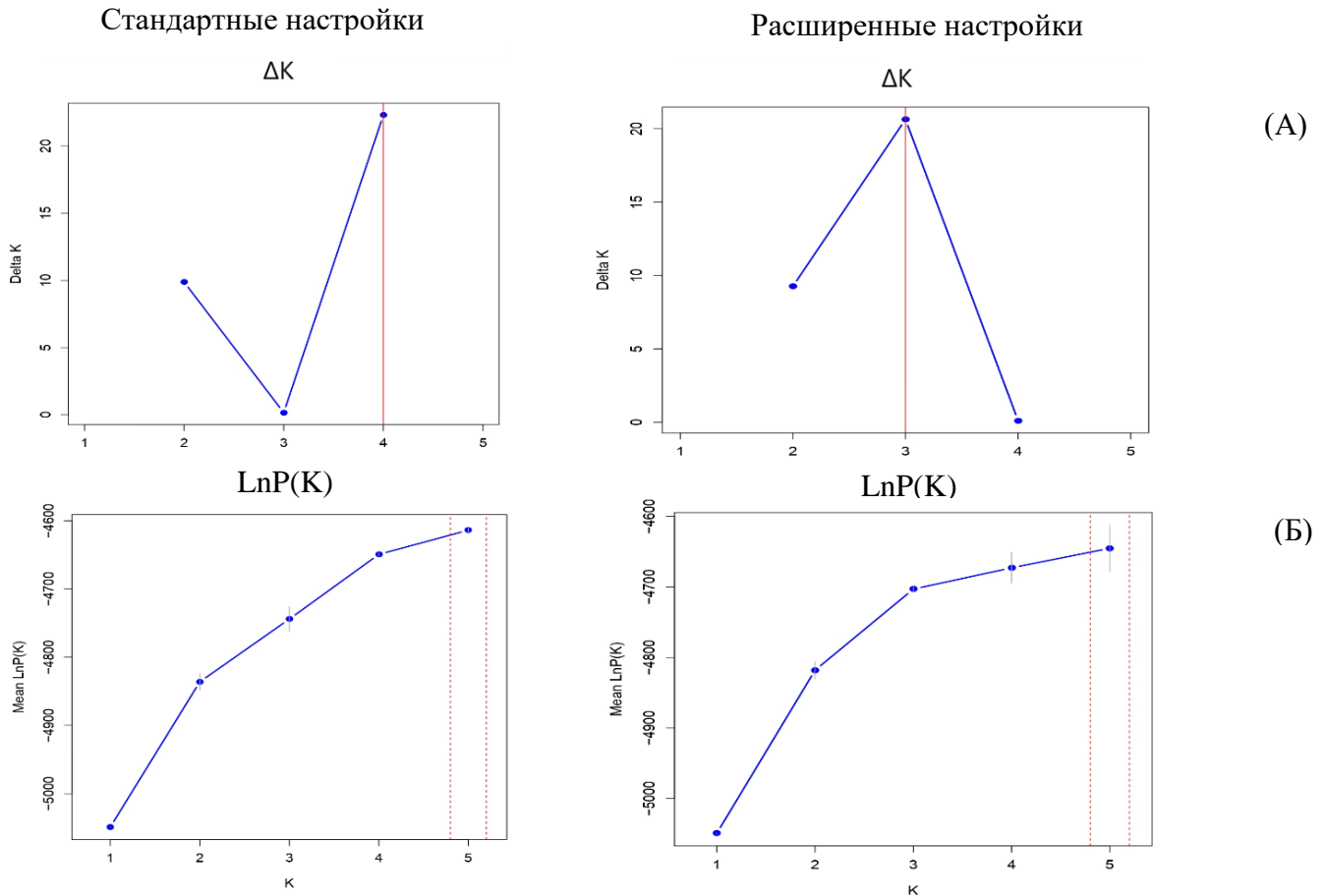


Рисунок 13 - Определение оптимального числа кластеров для выборок *Apostichopus japonicus* с использованием стандартных и расширенных настроек. А - определение ΔK для различного количества кластеров дальневосточного трепанга (графики сверху), Б - логарифмическое правдоподобие апостериорных вероятностей для определения наиболее подходящего числа кластеров.

С помощью программы StructureSelector было определено количество кластеров по альтернативной статистике (рис. 14). Для всех графиков оптимальным числом кластеров являлось 3, за исключением графиков максимума средних и максимума медиан при стандартных настройках, для них $K=4$.

Обобщенные результаты программы STRUCTURE представлены с помощью программы CLUMPAK (рис. 15). С использованием стандартных настроек программа выявила на основе всех прогонов минорные кластеры (один при $K=3$ и два при $K=5$). В этом случае генотипы были менее обособлены друг от друга, чем с расширенными настройками, выборка б. Федорова была всегда обособлена от других.

Анализ молекулярной дисперсии (табл. 20) был проведен в соответствии с группировкой выборок по нескольким вариантам:

- **вариант 1:** каждая выборка была представлена отдельно;

- **вариант 2:** группировка осуществлялась на основе стандартных генетических дистанций Нея и хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (группа 1 – выборки зал. Восток и б. Федорова, группа 2 – выборка зал. Посьета_2015, группа 3 – выборки зал. Посьета_2018 и м. Красный);

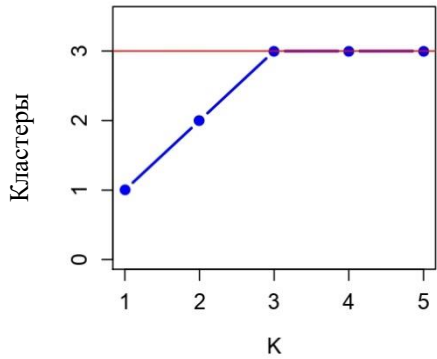
- **вариант 3:** группировка осуществлялась на основе Байесовской кластеризации (STRUCTURE) (группа 1 – выборка зал. Восток, группа 2 – выборка б. Федорова, группа 3 – выборки зал. Посьета и м. Красный).

Результаты показали (табл. 20), что значительное разнообразие наблюдалось на индивидуальном уровне во всех вариантах группировки (от 68.07% до 68.65%), индекс F_{ST} для этого иерархического уровня был значим ($P < 0.001$).

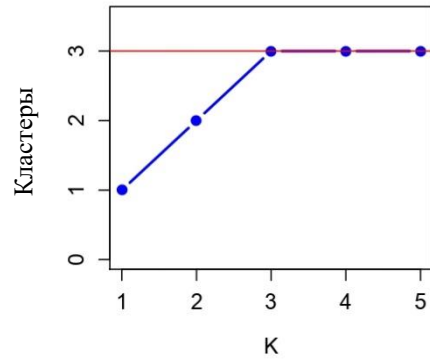
Стандартные настройки

Расширенные настройки

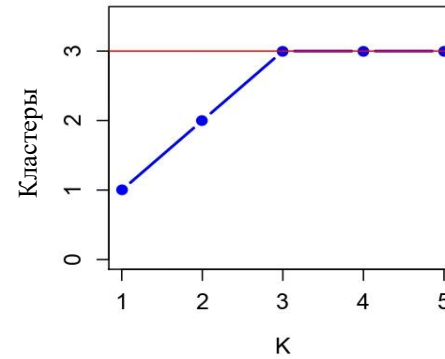
MedMed K



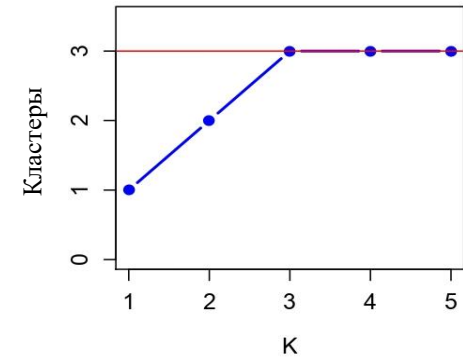
MedMean K



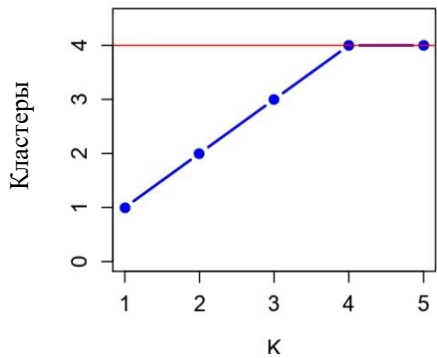
MedMed K



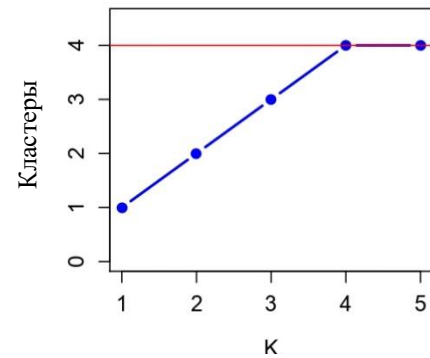
MedMean K



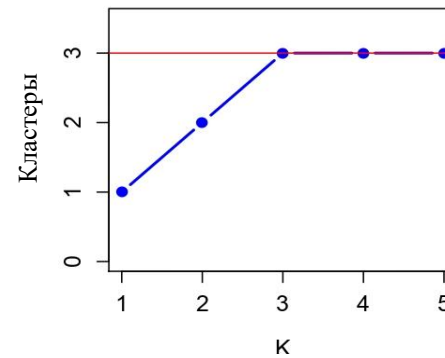
MaxMed K



MaxMean K



MaxMed K



MaxMean K

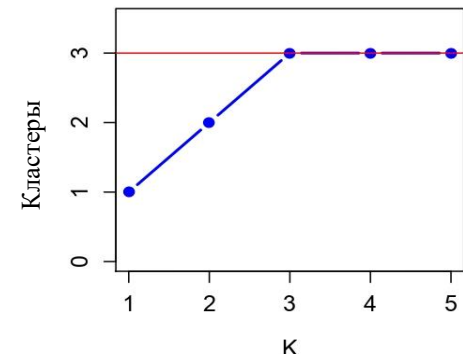


Рисунок 14 - Графики медианы средних (MedMeanK), медианы медиан (MedMedK), максимума средних (MaxMeanK) и максимума медиан (MaxMedK), построенные на основе прогонов данных в программе STRUCTURE с использованием стандартных и расширенных настроек.

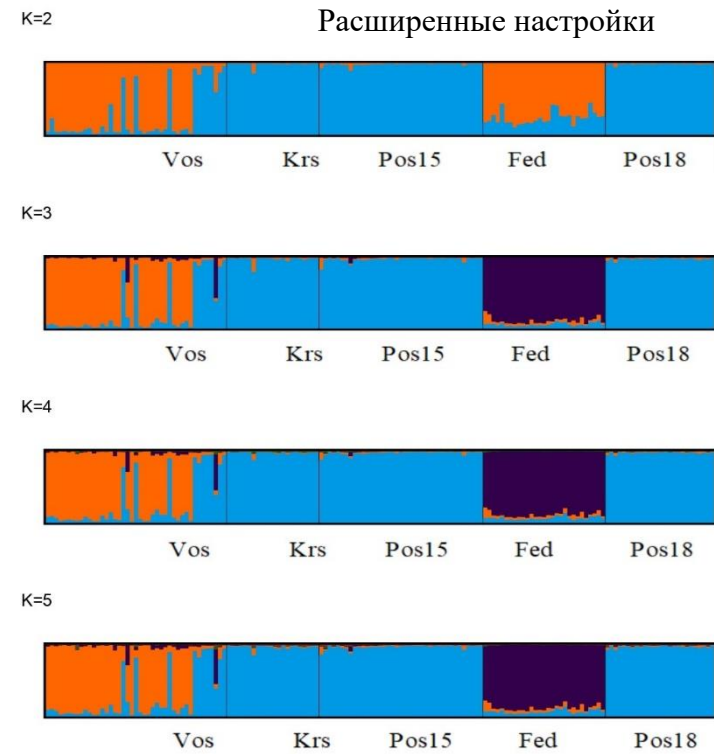
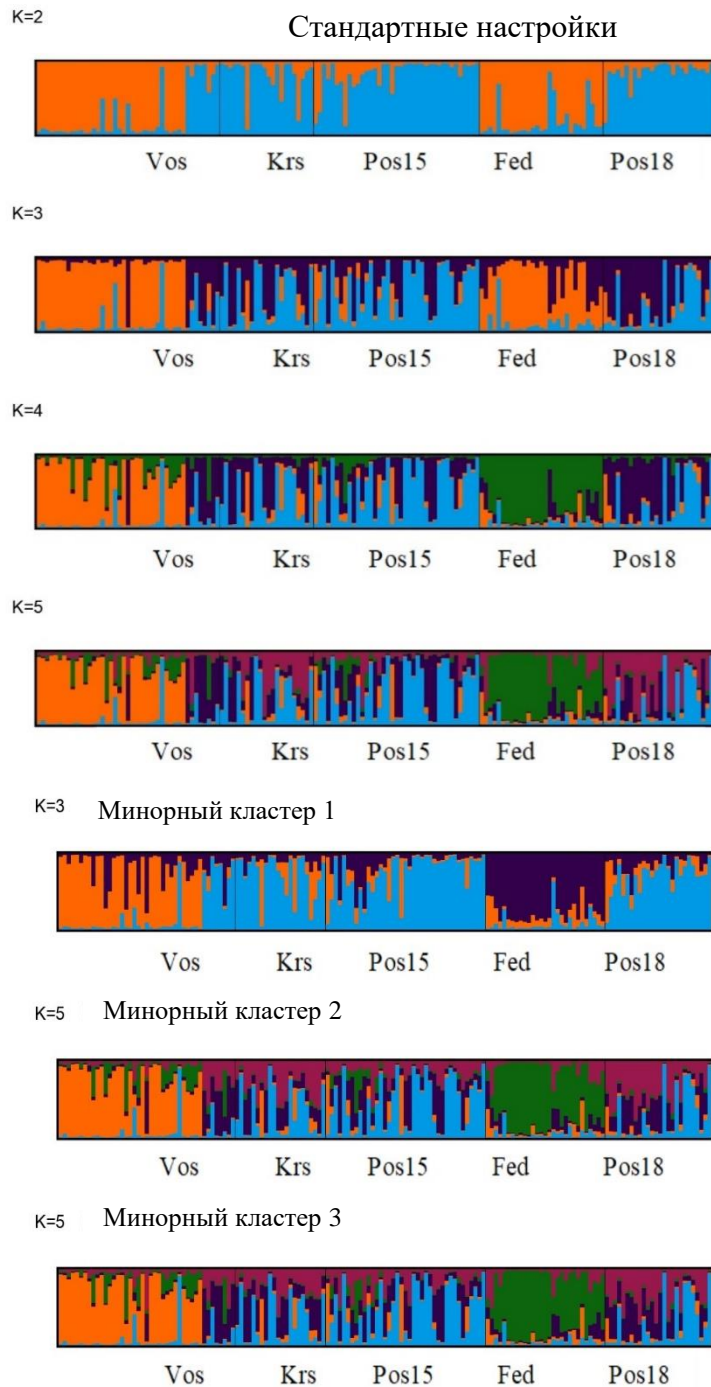


Рисунок 15 - Гистограммы, построенные на основе 20 прогонов для каждого K по результатам программы STRUCTURE со стандартными и расширенными настройками. По горизонтали указаны выборки *Apostichopus japonicus*.

Таблица 20 - Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) по частотам аллелей микросателлитных локусов для *Apostichopus jaronicus* при разных вариантах группировки выборок

Группы	d.f.	Сумма квадратов	Компоненты дисперсии	Процент дисперсии	Индекс	Вероятность (P)
Вариант 1:						
Среди выборок	4	33.277	0.10110	6.06	0.06060	0.00000***
Среди особей внутри выборок	154	306.402	0.42249	25.33	0.26959	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	182.000	1.14465	68.61	0.31385	0.00000***
Вариант 2:						
Среди групп	2	17.037	0	0	0	0.59644
Среди выборок внутри групп	2	16.240	0.10485	6.01	0.06271	0.00000***
Среди особей внутри выборок	154	306.402	0.42249	25.34	0.26959	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	182.000	1.14465	68.65	0.31351	0.00000***
Вариант 3:						
Среди групп	2	22.513	0.05396	3.21	0.03209	0.19544
Среди выборок внутри групп	2	10.764	0.06038	3.59	0.03710	0.00000***
Среди особей внутри выборок	154	306.402	0.42249	25.13	0.26959	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	182.000	1.14465	68.07	0.31926	0.00000***

Примечание. d.f. – число степеней свободы, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Для тестирования прохождения выборок через “горлышко бутылки” были использованы два различных теста программы BOTTLENECK, использующие мутационные модели IAM (модель бесконечных аллелей), TPM (двухступенчатая модель) и SMM (модель пошаговой мутации) (табл. 20). Также в программе BOTTLENECK было рассчитано смещение распределения частот аллелей микросателлитных локусов (рис. 16). Все графики имели нормальное L-образное распределение, характерное для относительно стабильных популяций.

Таблица 21 - Результаты тестирования прохождения выборками *Apostichopus japonicus* “горлышка бутылки” с помощью тестов программы BOTTLENECK.

Выборка	Тест, мутационная модель, вероятность						Сдвиг моды
	Знаков			Уилкоксона (двусторонний)			
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	
Vos	0.14766	0.06169	0.06384	0.02441*	0.13086	0.03223*	нет
Krs	0.34213	0.37922	0.05706	0.27539	0.32227	0.16016	нет
Pos15	0.13739	0.01458*	0.00171**	0.00977***	0.01367*	0.00684**	нет
Fed	0.00439**	0.20551	0.07161	0.00098	0.27539	0.10547	нет
Pos18	0.60991	0.06121	0.01485*	0.08398	0.08398	0.02441*	нет
Общее	0.37321	0.06580	0.00237**	0.02441*	0.01855*	0.00488**	нет

Примечание. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Значимые результаты (табл. 21) были получены для выборок зал. Посьета при использовании модели SMM, б. Федорова при использовании модели IAM и для выборки зал. Посьета_2015 (TPM) по тесту знаков. Для теста Уилкоксона P <0.05 наблюдалась при модели IAM – для всех, кроме м. Красный и зал. Посьета_2018; при модели SMM - для выборок зал. Восток и выборок зал. Посьета; при модели TPM – для выборки зал. Посьета_2015. Для генеральной совокупности выборок отклонение от равновесия мутации-дрейфа зарегистрировано при использовании теста Уилкоксона для всех мутационных моделей.

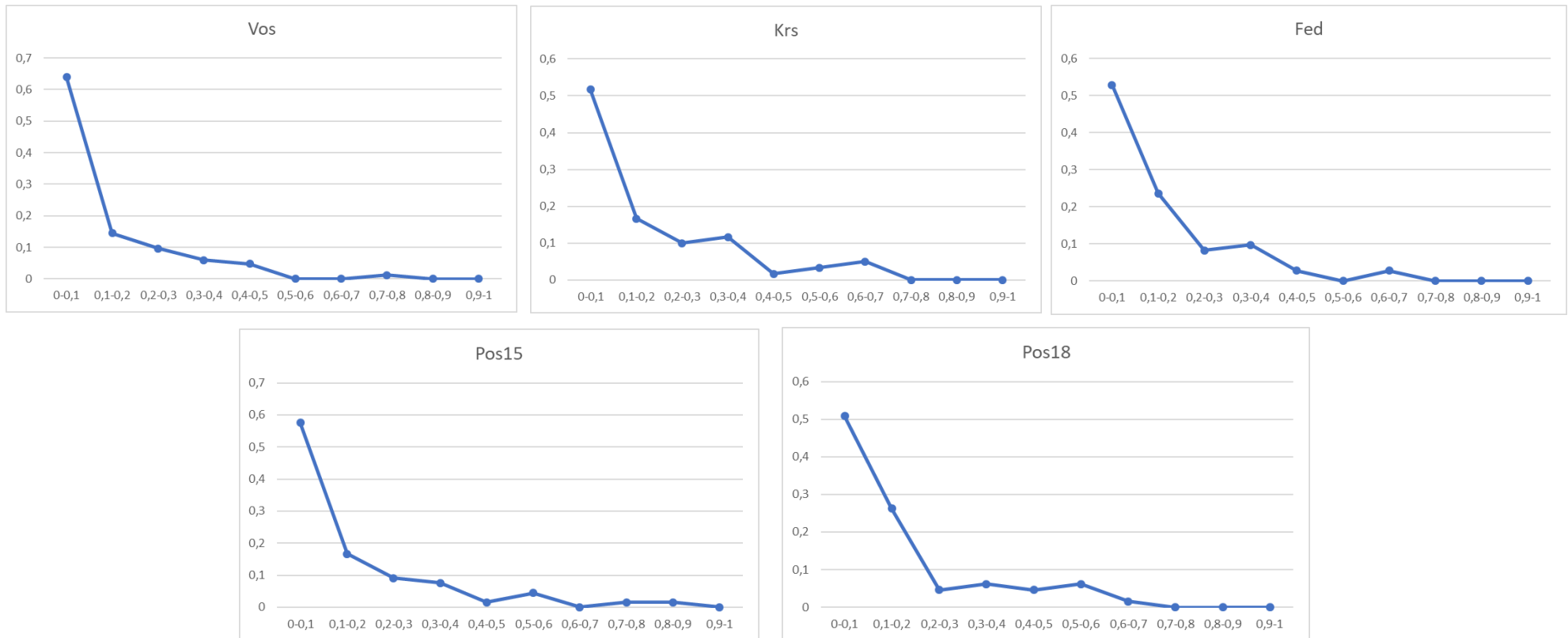


Рисунок 16 - Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в выборках *Apostichopus japonicus*, рассчитанное в программе BOTTLENECK. По оси ординат – пропорции аллелей, по оси абсцисс – частоты аллелей.

3.3. Определение нулевых аллелей в микросателлитных локусах яДНК

Ошибки генотипирования могут вызывать отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, что потенциально влияет на генетический анализ популяции. С помощью программы MICRO-CHECKER был проведен анализ присутствия в выборках неамплифицированных аллелей (*null-alleles*), доминирования коротких аллелей, или выпадения длинных аллелей (*large allele dropout*), а также «теневых полос». В результате доминирования коротких аллелей и «теневых полос» выявлено не было, однако были обнаружены нулевые аллели. Частоты нуль-аллелей представлены в таблице 22. Нулевые аллели присутствовали в четырех локусах из десяти, но определялись они не для каждой выборки. Так, нуль-аллели выявлены в локусе AJ20333 (зал. Восток, б. Федорова), AJ13361 (зал. Посьета_2018), Psj1828 (м. Красный, зал. Посьета_2018) и 3S16 (зал. Восток). Также были получены графики ожидаемых и наблюдаемых частот гомозигот для локусов, имеющих нулевые аллели (рис. 17).

Таблица 22 - Частота нулевых аллелей десяти исследуемых микросателлитных локусов для каждой выборки *Apostichopus japonicus*

Локус/Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
AJ20333	0.221	0.017	0.008	0.203	0.020
AJ10675	0.122	0.079	0.054	-0.058	0.093
AJ13361	0.174	0.161	0.186	0.129	0.237
PS205	-0.022	0.052	0.083	-0.050	0.040
Psj1828	0.031	0.250	0.118	0.120	0.226
Psj2889	0.040	0.010	0.078	0.060	0.153
Psj2409	0.169	0.029	0.104	0.176	0.082
Psj2464	0.060	0.193	0.079	0.135	0.164
FCS9	0.088	0.013	0.146	0.113	-0.028
3S16	0.236	0.080	0.079	0.190	0.146

Примечание. Серым цветом выделена частота тех локусов, для которых обнаружены нулевые аллели.

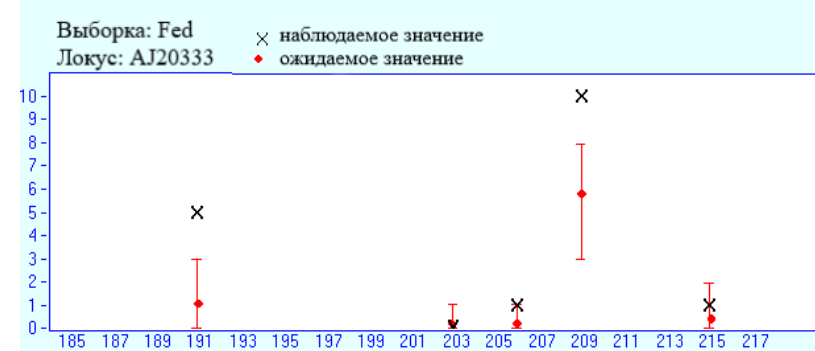
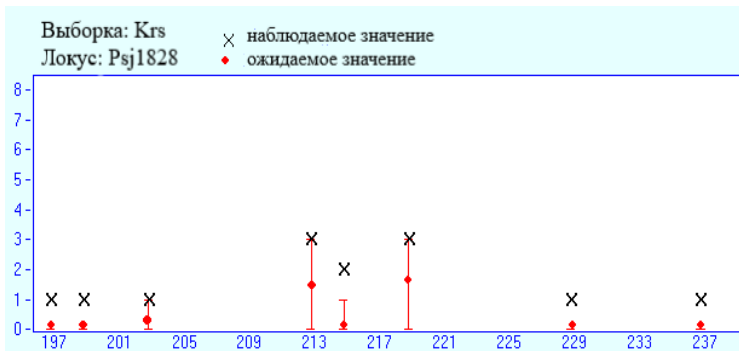
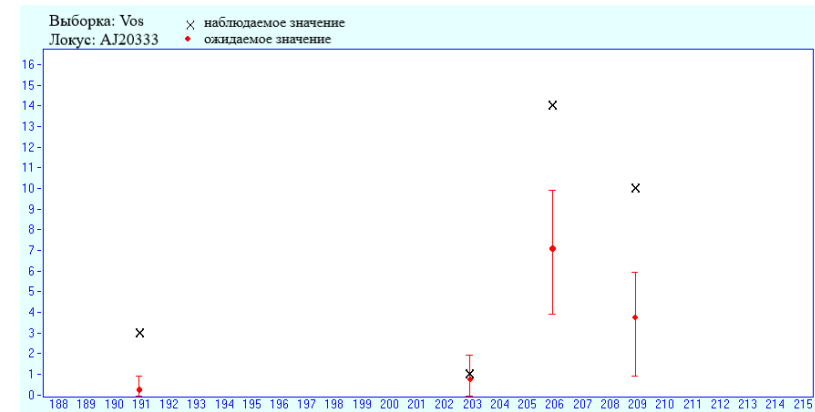
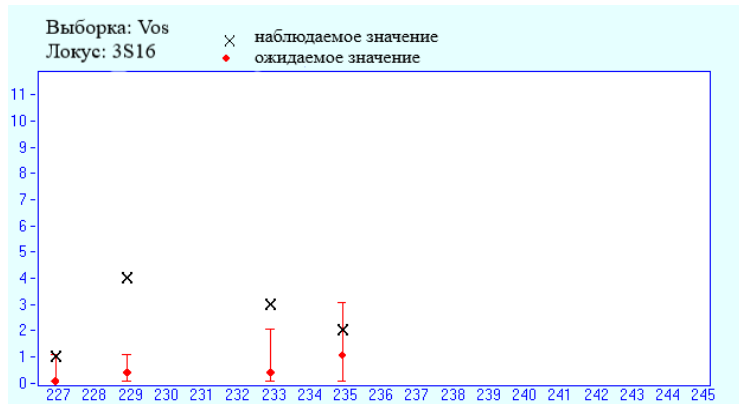


Рисунок 17 - Частота гомозигот в выборках *Apostichopus japonicus* для микросателлитных локусов, имеющих нулевые аллели. Доверительный интервал для графиков - 95%. По оси абсцисс показан размер аллеля, по оси ординат – частота встречаемости.

Как видно из графиков (рис. 17), наблюдаемые значения частот гомозигот либо были на границе доверительного интервала, либо выходили за него. Это свидетельствует о возможном избытке гомозигот в данных локусах, вследствие чего эти локусы были определены как содержащие нулевые аллели. В программе MICRO-CHECKER ошибки генотипирования были исправлены и далее приведены данные с учетом коррекции.

3.3.1 Изучение генетического разнообразия и дифференциации выборки *Apostichopus japonicus* по микросателлитным локусам яДНК с коррекцией результатов по нулевым аллелям

Неравновесие по сцеплению (табл. 23) было выявлено между локусами AJ10675 и AJ13361 ($P < 0.001$) при 45 парных сравнениях локусов для всех выборок.

Таблица 23 - Тестирование неравновесия по сцеплению пар микросателлитных локусов для выборок *Apostichopus japonicus* по скорректированным данным. Для каждой пары указана вероятность (P): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Пары локусов		P	Пары локусов		P
AJ20333	AJ10675	0.948163	AJ13361	Psj2464	0.139980
AJ20333	AJ13361	0.000632***	PS205	Psj2464	0.955198
AJ10675	AJ13361	0.730767	Psj1828	Psj2464	0.796631
AJ20333	PS205	0.939255	Psj2889	Psj2464	0.651672
AJ10675	PS205	0.523979	Psj2409	Psj2464	0.337425
AJ13361	PS205	0.787775	AJ20333	FCS9	0.255049
AJ20333	Psj1828	0.929338	AJ10675	FCS9	0.094086
AJ10675	Psj1828	0.070065	AJ13361	FCS9	0.368344
AJ13361	Psj1828	0.934518	PS205	FCS9	0.732001
PS205	Psj1828	0.555920	Psj1828	FCS9	0.084512
AJ20333	Psj2889	0.626872	Psj2889	FCS9	0.218529
AJ10675	Psj2889	0.913605	Psj2409	FCS9	0.696072
AJ13361	Psj2889	0.108987	Psj2464	FCS9	0.285166
PS205	Psj2889	0.941425	AJ20333	3S16	0.849841
Psj1828	Psj2889	0.449460	AJ10675	3S16	0.172252
AJ20333	Psj2409	0.908289	AJ13361	3S16	0.024581*
AJ10675	Psj2409	0.415993	PS205	3S16	0.201051
AJ13361	Psj2409	0.811884	Psj1828	3S16	0.867990
PS205	Psj2409	0.213094	Psj2889	3S16	0.364091

Psj1828	Psj2409	0.334346	Psj2409	3S16	0.410660
Psj2889	Psj2409	0.269111	Psj2464	3S16	0.356738
AJ20333	Psj2464	0.391840	FCS9	3S16	0.985406
AJ10675	Psj2464	0.879017			

Результаты тестов на нейтральность для всех локусов по всем выборкам представлены в таблицах 24 и 25. Для теста Эванса-Ваттерсона (табл. 24) большинство локусов были нейтральны и не связаны с каким-либо признаком, так как показатели наблюдаемой гомозиготности (*Obs. F*) лежат в пределах верхнего и нижнего значения 95% доверительного интервала. Наблюдаемая гомозиготность (*obs. F*) находилась за пределом доверительного интервала только в локусе AJ10675.

Таблица 24 - Тест Эванса-Ваттерсона на нейтральность десяти микросателлитных локусов *Apostichopus japonicus* по скорректированным данным

Локус	Obs. <i>F</i>	SE	L95	U95
AJ20333	0.2959	0.0112	0.1453	0.5666
AJ10675	0.2821	0.0329	0.2844	0.9160
AJ13361	0.4040	0.0295	0.2450	0.8822
PS205	0.3036	0.0115	0.1488	0.5560
Psj1828	0.2422	0.0082	0.1324	0.4996
Psj2889	0.1646	0.0134	0.1637	0.6018
Psj2409	0.2740	0.0087	0.1340	0.4950
Psj2464	0.2497	0.0114	0.1517	0.5602
FCS9	0.2438	0.0176	0.1907	0.6954
3S16	0.1551	0.0118	0.1507	0.5688

Примечание. *Obs. F* – наблюдаемая гомозиготность, SE – стандартная ошибка, L95 – нижняя граница доверительного интервала 95%, U95 – верхняя граница доверительного интервала 95%.

С использованием теста на нейтральность в программе BayeScan четыре микросателлитных локуса демонстрировали возможное отклонение от нейтральности (табл. 25), для них показатель *q* был значим ($q < 0.05$): AJ10675, PS205, Psj2889, Psj2409. α -коэффициент имел отрицательные величины для этих локусов, за исключением AJ10675.

Таблица 25 - Тест на нейтральность десяти микросателлитных локусов *Apostichopus japonicus*, выполненный в программе BayeScan по скорректированным данным

Локус	F_{st}	α	q
AJ20333	0.083	-0.002	0.472
AJ10675	0.342	1.781	0.000***
AJ13361	0.110	0.259	0.166
PS205	0.022	-1.504	0.001***
Psj1828	0.044	-0.786	0.058
Psj2889	0.013	-2.065	0.000***
Psj2409	0.023	-1.447	0.004**
Psj2464	0.083	-0.009	0.350
FCS9	0.083	-0.004	0.418
3S16	0.077	-0.097	0.264

Примечание. F_{st} - коэффициент F_{st} , усредненный по выборкам; α - альфа-коэффициент, указывающий на силу и направление отбора; q – значение отклонения от модели нейтральности, * $q < 0.05$, ** $q < 0.01$, *** $q < 0.001$

Были получены показатели генетического разнообразия для выборок дальневосточного трепанга по локусам, для которых определены нулевые аллели. Результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 - 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	H_o	H_e	F_{is}	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.

Для всех скорректированных данных было отмечено увеличение индекса разнообразия Шеннона, уменьшение разницы между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью, а также уменьшение коэффициента инбридинга (табл. 26). Средние значения по всем выборкам изменились незначительно. Все выборки по скорректированным данным также отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга ($P < 0.05$).

При тестировании дифференциации выборок значения F_{st} (табл. 27) варьировали от 0.012 (между зал. Посыета_2018 и м. Красный) до 0.107 (между б. Федорова и м. Красный). Попарное сравнение групп особей, собранных в

зал. Посьета в разные годы, демонстрирует значение 0.044, что больше, чем между зал. Посьета_2018 и м. Красный (0.012) и между зал. Посьета_2015 и м. Красный (0.035). После коррекции нулевых аллелей только пара зал. Посьета_2018 и зал. Восток оказалась незначимой ($P > 0.05$).

Таблица 27 - Тестирование уровня дифференциации выборок *Apostichopus japonicus* по скорректированным данным: значения F_{st} ниже диагонали, достоверность значений F_{st} – выше диагонали (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.002**	0.002**	0.005**	0.065
Krs	0.071		0.005**	0.000***	0.000***
Pos15	0.088	0.035		0.022*	0.003**
Fed	0.059	0.107	0.096		0.001***
Pos18	0.081	0.012	0.044	0.097	

Стандартные генетические дистанции Нея (табл. 28) показали сходные с хорд-дистанциями Кавалли-Сфорца и Эдвардса результаты: наименьший показатель наблюдался между выборками зал. Посьета_2018 и м. Красный (0.094 и 0.269 соответственно), наибольший – между б. Федорова и м. Красный (0.408 и 0.414 соответственно). Косвенное определение потока генов (Nm) продемонстрировало значения от 3.491 между выборками зал. Восток и зал. Посьета_2015 до 12.083 между выборками м. Красный и зал. Посьета_2018 (табл. 29).

Таблица 28 - Значения стандартных генетических дистанций Нея (под диагональю) и хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (над диагональю) между выборками *Apostichopus japonicus* по скорректированным данным

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
Vos		0.341	0.314	0.327	0.340
Krs	0.252		0.274	0.414	0.269
Pos15	0.308	0.122		0.367	0.283
Fed	0.267	0.408	0.338		0.400
Pos18	0.308	0.094	0.158	0.380	

Таблица 29 - Оценка потока генов (Nm) между выборками *Apostichopus japonicus* по скорректированным данным

Выборка	Vos	Krs	Pos15	Fed
Vos				
Krs	4.890			
Pos15	3.491	7.438		
Fed	5.145	3.261	3.646	
Pos18	4.318	12.083	6.565	3.578

После корректировки генотипов отличий в кластеризации выборок на дендрограммах обнаружено не было (рис. 18А, 18Б). Для генеральной совокупности *A. japonicus* зал. Петра Великого нулевые аллели оказали влияние на устойчивость топологии дендрограмм, увеличивая статистические значения бутстрэп-поддержек некоторых узлов.

Анализ на основе Байесовской кластеризации (STRUCTURE, рис. 19) показал наиболее четкие границы между всеми выборками при $K=2$. Графически в отдельный кластер выделяются группы особей зал. Восток и б. Федорова, остальные формируют смешанную группу. Однако в интервале от $K=3$ до $K=5$ границы между выборками становились нечеткими. С использованием расширенных настроек выборки зал. Восток и б. Федорова при $K=2$ обособлялись от выборок м. Красный, зал. Посыета разных годов, при $K=3$ б. Федорова и зал. Восток разделяются на отдельные кластеры, причем выборка б. Федорова отличается от других выборок сильнее, чем особи из зал. Восток.

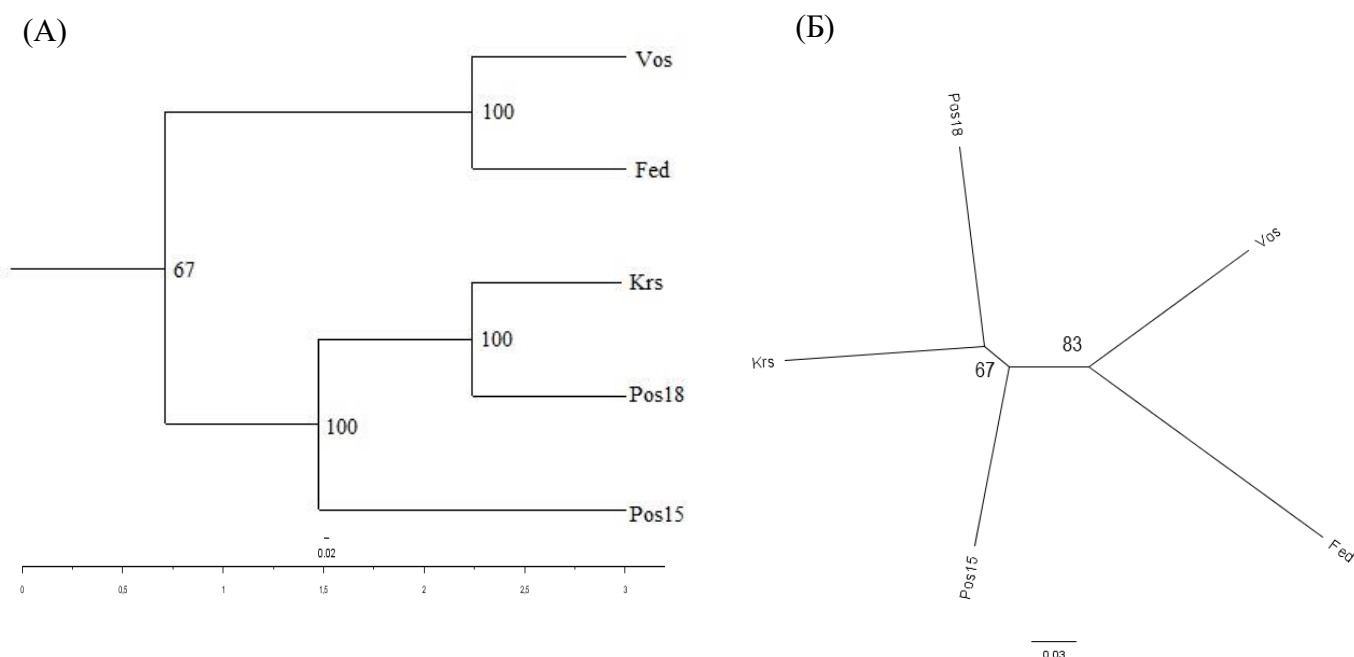


Рисунок 18 - Фенетические отношения выборок *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов яДНК по скорректированным данным. А – UPGMA- дендрограмма, построенная на основе стандартных дистанций Нея (Yagodina et al., 2022). Б - NJ-дендрограмма, построенная на основе хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса.

При использовании расширенных настроек при числе кластеров больше трех дополнительные обособления выборок не происходили: (1) выборка б. Федорова также обособлена, (2) выборка зал. Восток менее гетерогенна, (3) остальные выборки представляют единый кластер. В режиме стандартных настроек все выборки менее гетерогенны, относительная подразделенность наблюдается только при $K=2$ для выборок зал. Восток (рис. 19).

На основе результатов Байесовской кластеризации были определены показатели ΔK с помощью метода Эванно (рис. 20А). Оптимальное число кластеров на основе ΔK наблюдалось при $K=2$ для стандартных и расширенных настроек. Наибольшее среднее значение логарифмического правдоподобия апостериорных вероятностей (рис. 20Б) наблюдалось при $K=5$ для стандартных настроек и $K=3$ с расширенными настройками.

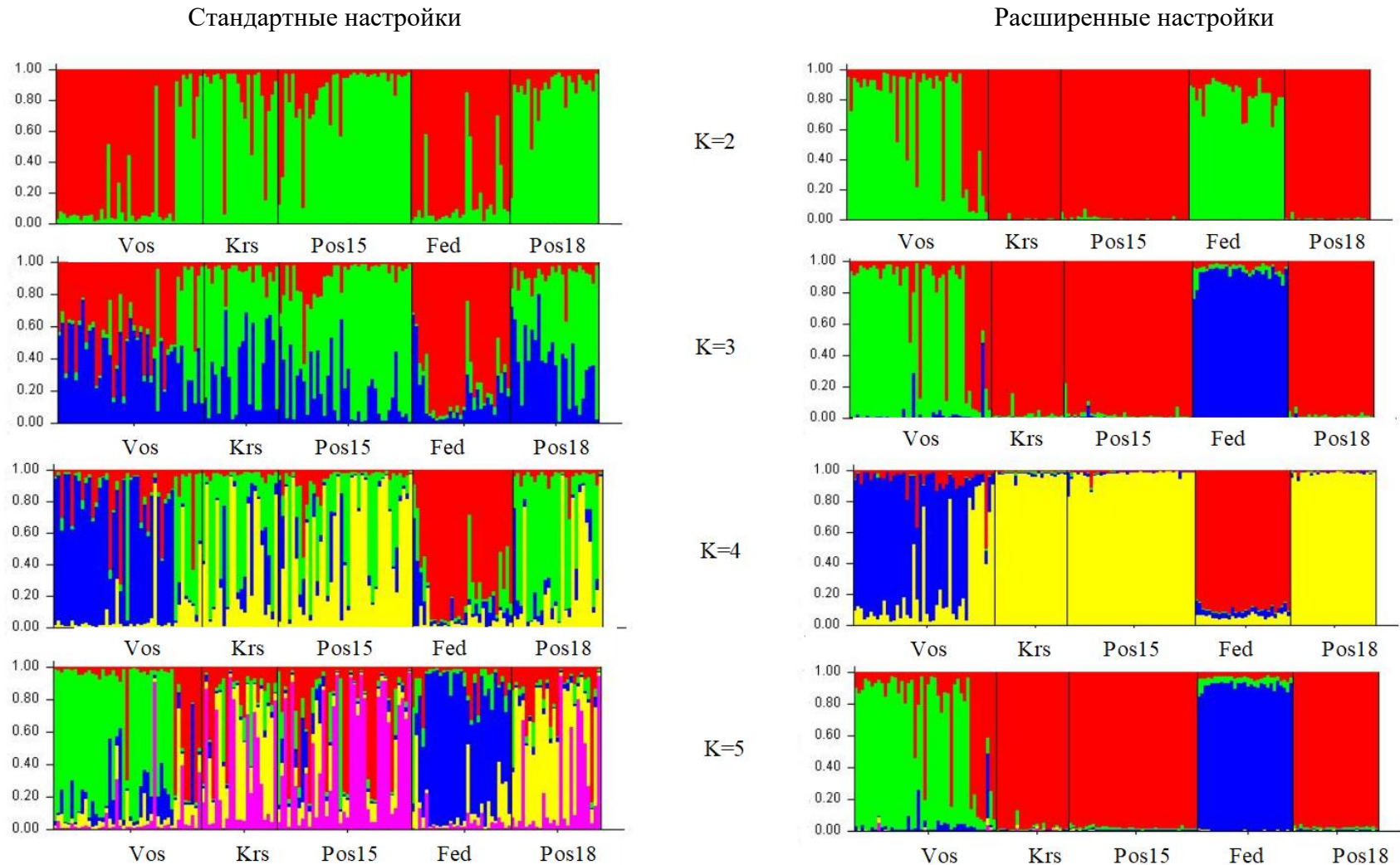


Рисунок 19 - Структура распределения генотипов в выборках *Apostichopus japonicus* при значениях K от 2 до 5 по скорректированным данным для стандартных (Yagodina et al., 2022) и расширенных настроек. Каждая особь представлена одной вертикальной линией, разбитой на K цветных сегментов, длина которых пропорциональна каждому из K предполагаемых кластеров. По горизонтали указаны predetermined выборки.

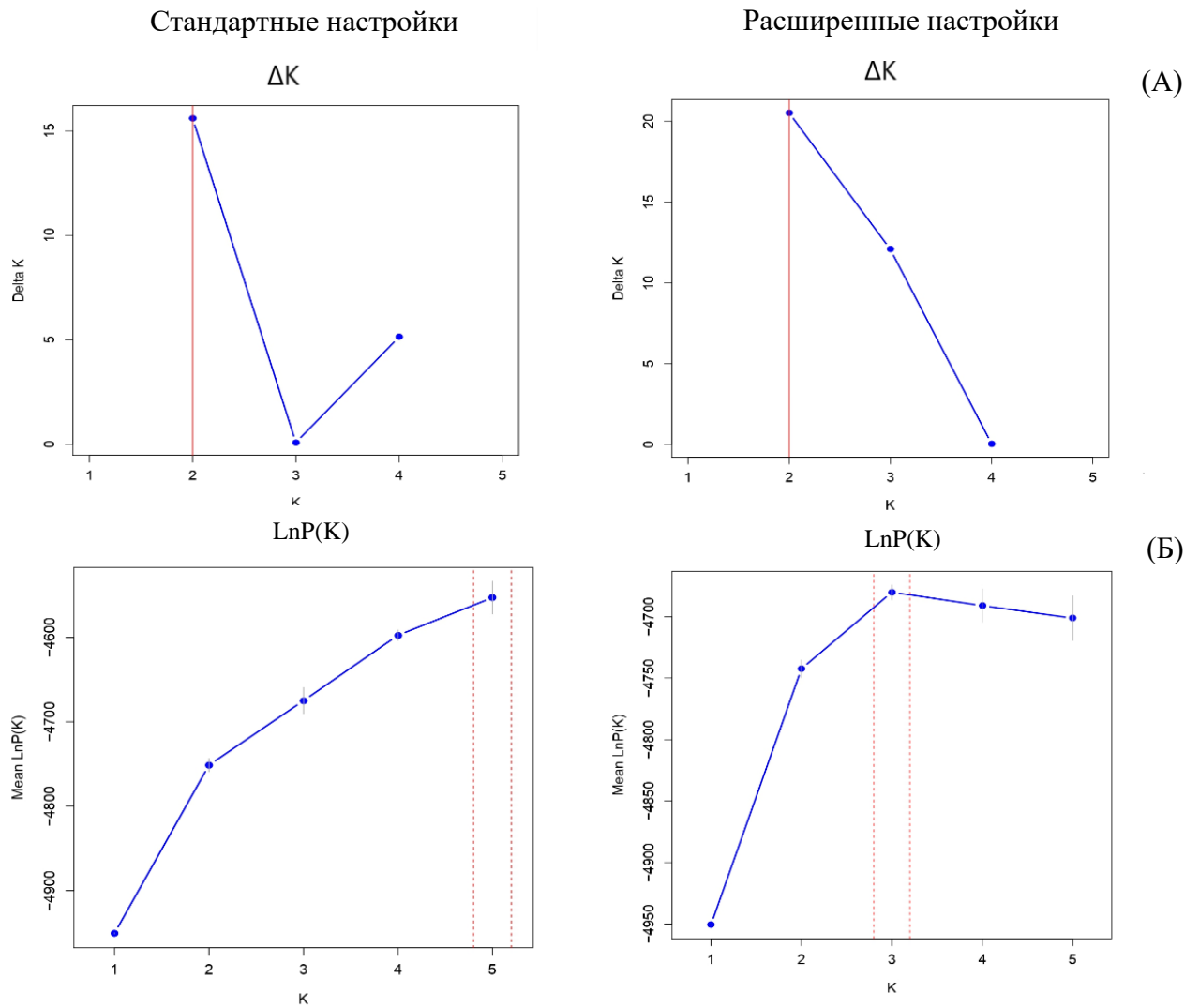


Рисунок 20 - Определение оптимального числа кластеров для выборок *Apostichopus japonicus* с использованием стандартных и расширенных настроек по скорректированным данным. А - определение ΔK для различного количества кластеров (графики сверху), Б - логарифмическое правдоподобие апостериорных вероятностей для определения наиболее вероятного числа кластеров.

С помощью программы StructureSelector было определено количество кластеров по альтернативной статистике (рис. 21). Для всех графиков стандартных настроек оптимальным числом кластеров являлось 4, с использованием расширенных настроек – 3.

Обобщенные результаты Байесовской кластеризации представлены с помощью программы CLUMPAK (рис. 22). С использованием стандартных настроек программа выявила на основе всех прогонов минорные кластеры (два при $K=5$). Генотипы были менее обособлены друг от друга, чем с расширенными настройками. Выборка б. Федорова была всегда наиболее обособлена от других.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) был проведен в соответствии с группировкой выборок по нескольким вариантам:

- **вариант 1:** каждая выборка была представлена отдельно;
- **вариант 2:** группировка осуществлялась на основе стандартных генетических дистанций Нея и хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (группа 1 – выборки зал. Восток и б. Федорова, группа 2 – выборка зал. Посьета_2015, группа 3 – выборки зал. Посьета_2018 и м. Красный);
- **вариант 3:** группировка осуществлялась на основе данных Байесовской кластеризации (группа 1 – выборка зал. Восток, группа 2 – выборка б. Федорова, группа 3 – выборки зал. Посьета и м. Красный).

Результаты показали (табл. 30), что значительное разнообразие наблюдалось на индивидуальном уровне во всех вариантах группировки (от 83.50% до 83.63%), индекс F_{ST} для этого иерархического уровня был значим ($P < 0.001$). Объединение выборок по группам мало повлияло на величину составляющих компонент, поскольку межгрупповые компоненты дисперсии статистически не поддержаны ($P > 0.05$).

Таблица 30 - Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) по частотам аллелей микросателлитных локусов для *Apostichopus jaronicus* при разных вариантах группировки выборок по скорректированным данным

Группы	d.f.	Сумма квадратов	Компоненты варианты	Процент дисперсии	Индекс	Вероятность (P)
Вариант 1:						
Среди выборок	4	4.521	0.00584	0.88	0.00877	0.49210
Среди особей внутри выборок	154	117.696	0.10383	15.58	0.15721	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	88.500	0.55660	83.54	0.16461	0.00000***
Вариант 2:						
Среди групп	2	2.090	0	0	0	0.69613
Среди выборок внутри групп	2	2.430	0.00803	1.21	0.01201	0.09589
Среди особей внутри выборок	154	117.696	0.10383	15.38	0.15721	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	88.500	0.55660	83.41	0.16371	0.00000***
Вариант 3:						
Среди групп	2	1.273	0.00094	0.13	0.00141	0.30437
Среди выборок внутри групп	2	3.247	0.00525	0.79	0.00789	0.11757
Среди особей внутри выборок	154	117.696	0.10383	15.58	0.15721	0.00000***
Индивидуальный уровень	159	88.500	0.55660	83.50	0.16504	0.00000***

Примечание. d.f. – число степеней свободы, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Мы провели анализ в программе STRUCTURE также с использованием шести микросателлитных локусов, которые не отклонялись от гипотезы нейтральности при использовании статистических тестов. При исключении локусов AJ10675, PS205, Psj2889, Psj2409 мы получили результирующие гистограммы на основе 20 прогонов в программе CLUMPAK (рис. 23), а также графики оптимального числа кластеров в программе StructureSelector (рис. 24), подтверждающие гетерогенность.

Стандартные настройки

Расширенные настройки

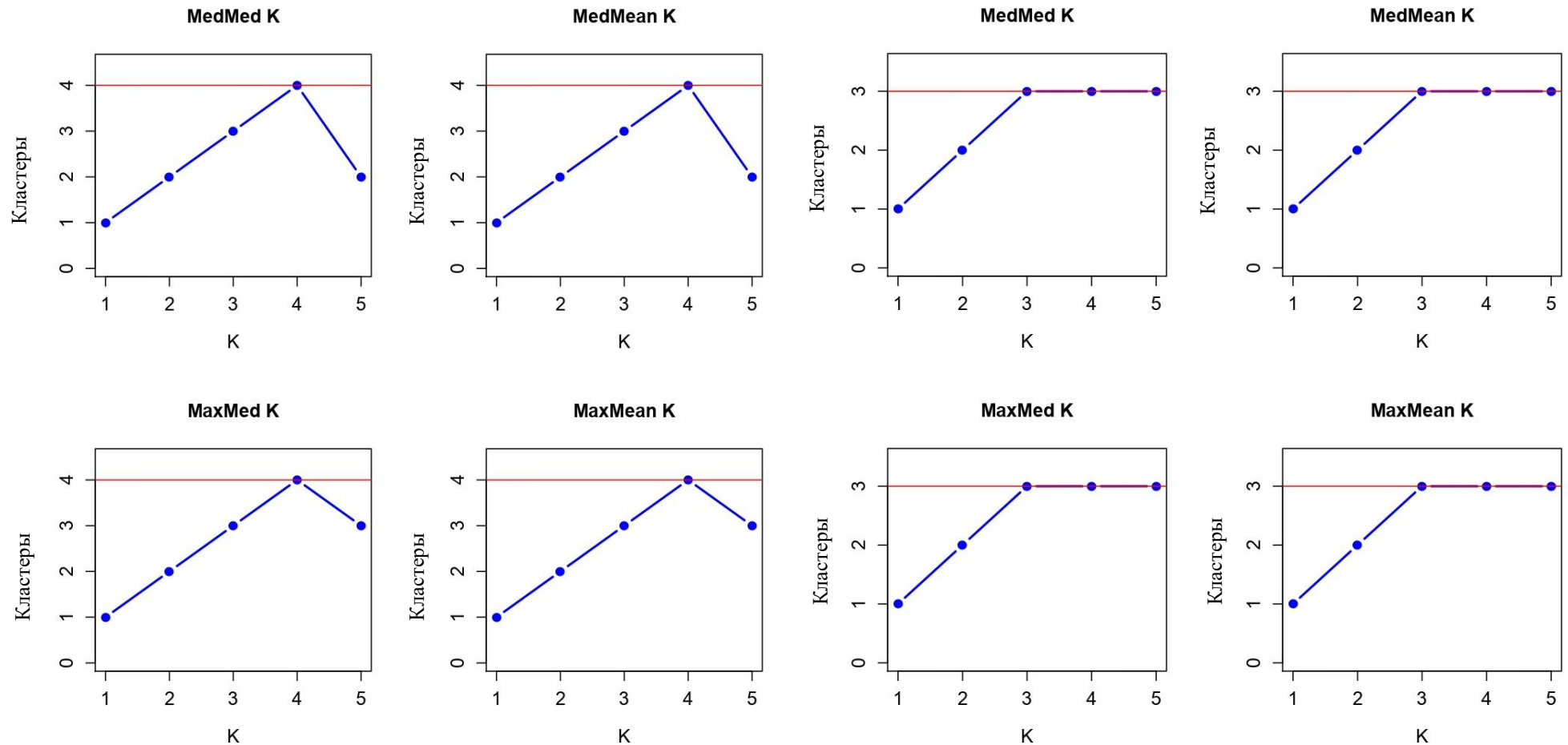


Рисунок 21 - Графики медианы средних (MedMeanK), медианы медиан (MedMedK), максимума средних (MaxMeanK) и максимума медиан (MaxMedK), построенные на основе прогонов данных в программе STRUCTURE с использованием стандартных и расширенных настроек по скорректированным данным.

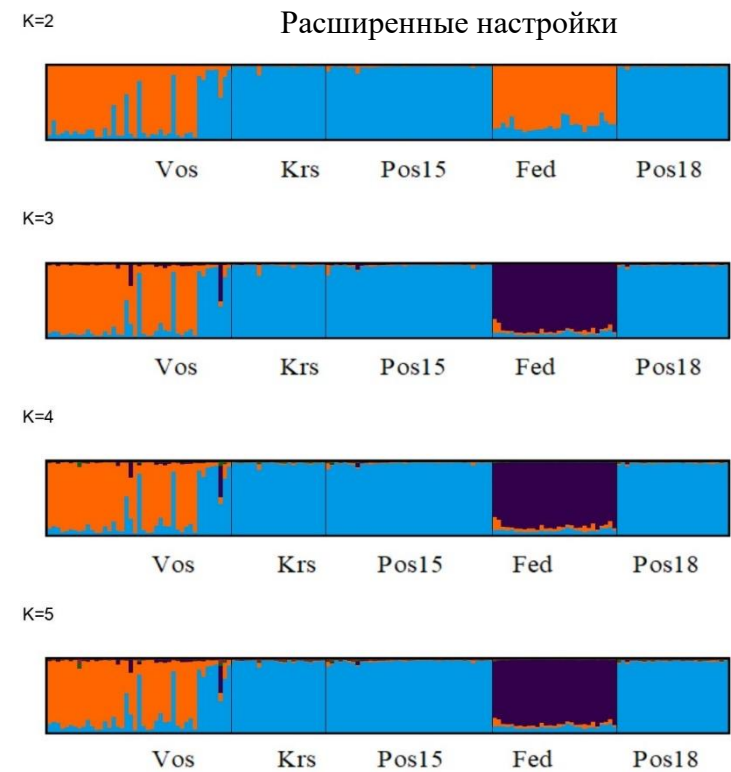
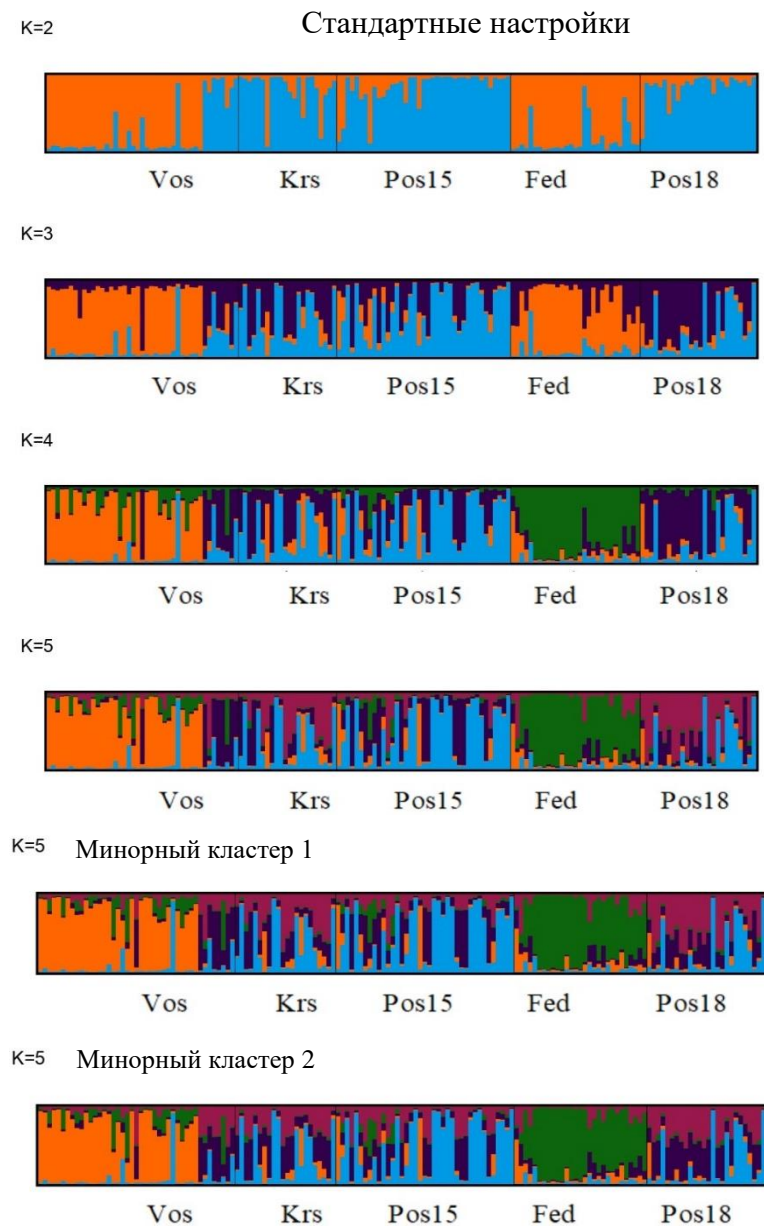


Рисунок 22 - Гистограммы, построенные на основе 20 прогонов для каждого K по результатам программы STRUCTURE со стандартными и расширенными настройками по скорректированным данным. По горизонтали указаны выборки *Apostichopus japonicus*.

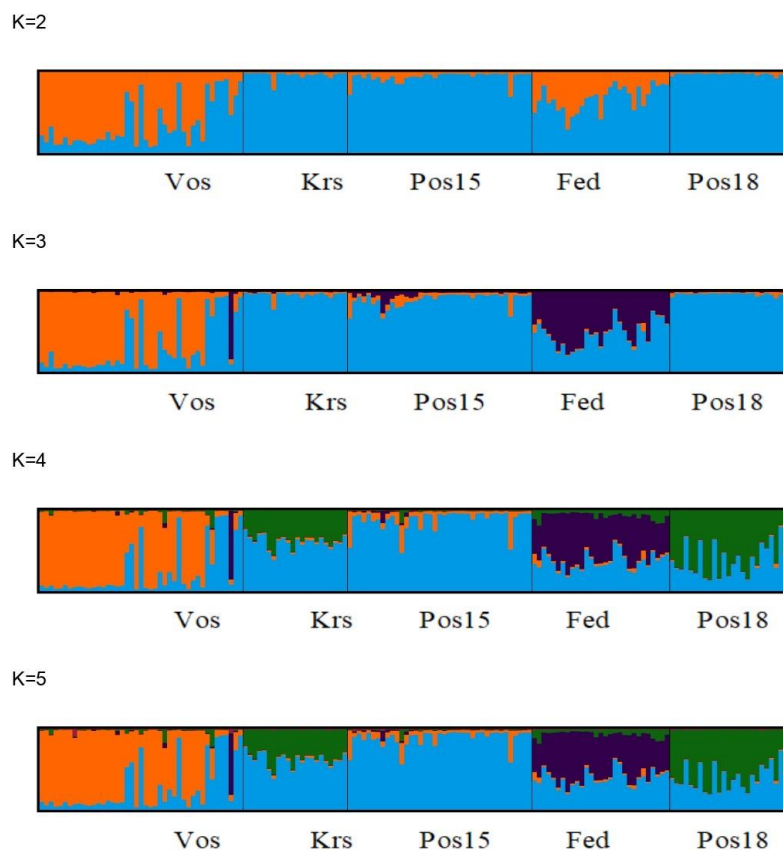


Рисунок 23 - Гистограммы, построенные на основе 20 прогонов для каждого K по результатам программы STRUCTURE с расширенными настройками по скорректированным данным. По горизонтали указаны выборки *Apostichopus japonicus*.

Для тестирования прохождения выборок через “горлышко бутылки” была применена программа BOTTLENECK (табл. 31). Рассчитано смещение распределения частот аллелей микросателлитных локусов (рис. 25), все графики имели нормальное L-образное распределение, характерное для относительно стабильных популяций.

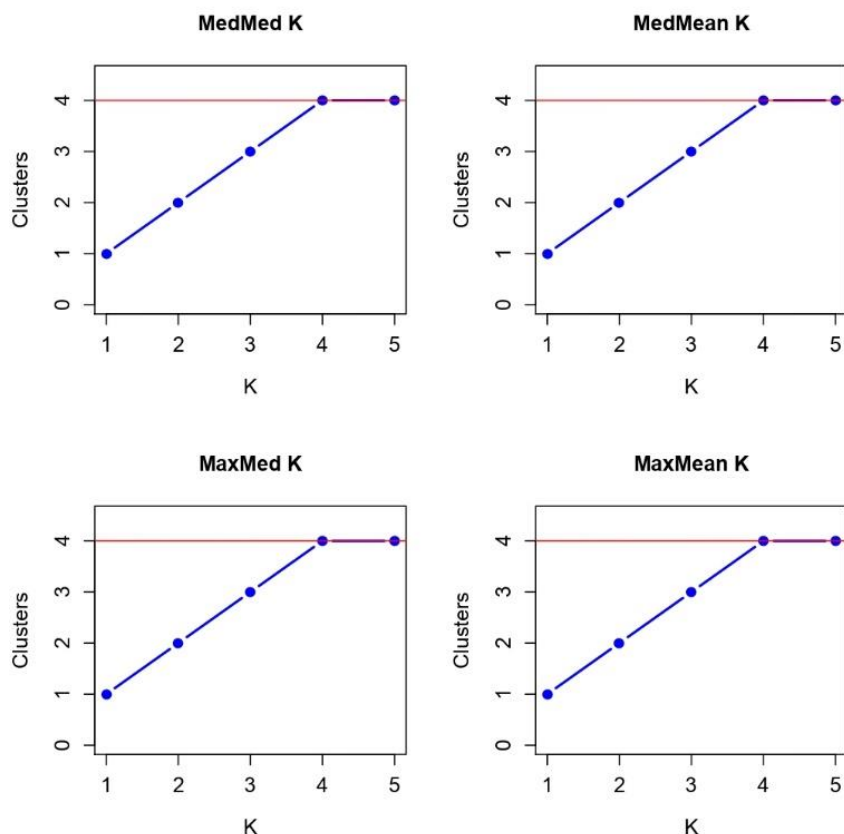


Рисунок 24 - Графики медианы средних (MedMeanK), медианы медиан (MedMedK), максимума средних (MaxMeanK) и максимума медиан (MaxMedK), построенные на основе прогонов данных в программе STRUCTURE с использованием расширенных настроек по скорректированным данным.

После корректировки генотипов (табл. 31) отличия наблюдались в нескольких случаях: для выборки б. Федорова при модели SMM результат был значим (тест знаков); выборка зал. Восток при модели IAM не отклонялась от нулевой гипотезы (тест Уилкоксона).

В программе BOTTLENECK был проведен анализ с использованием шести микросателлитных локусов, которые не отклонялись от гипотезы нейтральности при использовании статистических тестов (табл. 32). При исключении локусов AJ10675, PS205, Psj2889, Psj2409 значительных отличий от результата для десяти локусов по скорректированным генотипам (табл. 31) обнаружено не было.

Таблица 31 - Результаты тестирования прохождения выборками *Apostichopus japonicus* “горлышка бутылки” с помощью тестов программы BOTTLENECK по скорректированным данным

Выборка	Тест, мутационная модель, вероятность						Сдвиг моды
	Знаков			Уилкоксона (двусторонний)			
	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, ***P<0.001.

Таблица 32 - Результаты тестирования прохождения выборками *Apostichopus japonicus* “горлышка бутылки” с помощью тестов программы BOTTLENECK по селективно нейтральным локусам

Выборка	Тест, мутационная модель, вероятность						Сдвиг моды
	Знаков			Уилкоксона (двусторонний)			
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	
Vos	0.15580	0.18218	0.06343	0.02441*	0.15625	0.03223*	нет
Krs	0.34251	0.47710	0.17808	0.27539	1.00000	0.23242	нет
Pos15	0.13789	0.00451**	0.00197**	0.00977**	0.01563*	0.00684**	нет
Fed	0.00481**	0.46156	0.07377	0.00098***	0.43750	0.10547	нет
Pos18	0.61928	0.47020	0.01372**	0.08398	0.56250	0.02441*	нет
Общее	0.22375	0.04987	0.00479**	0.04688	0.03125*	0.01563*	нет

Примечание. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

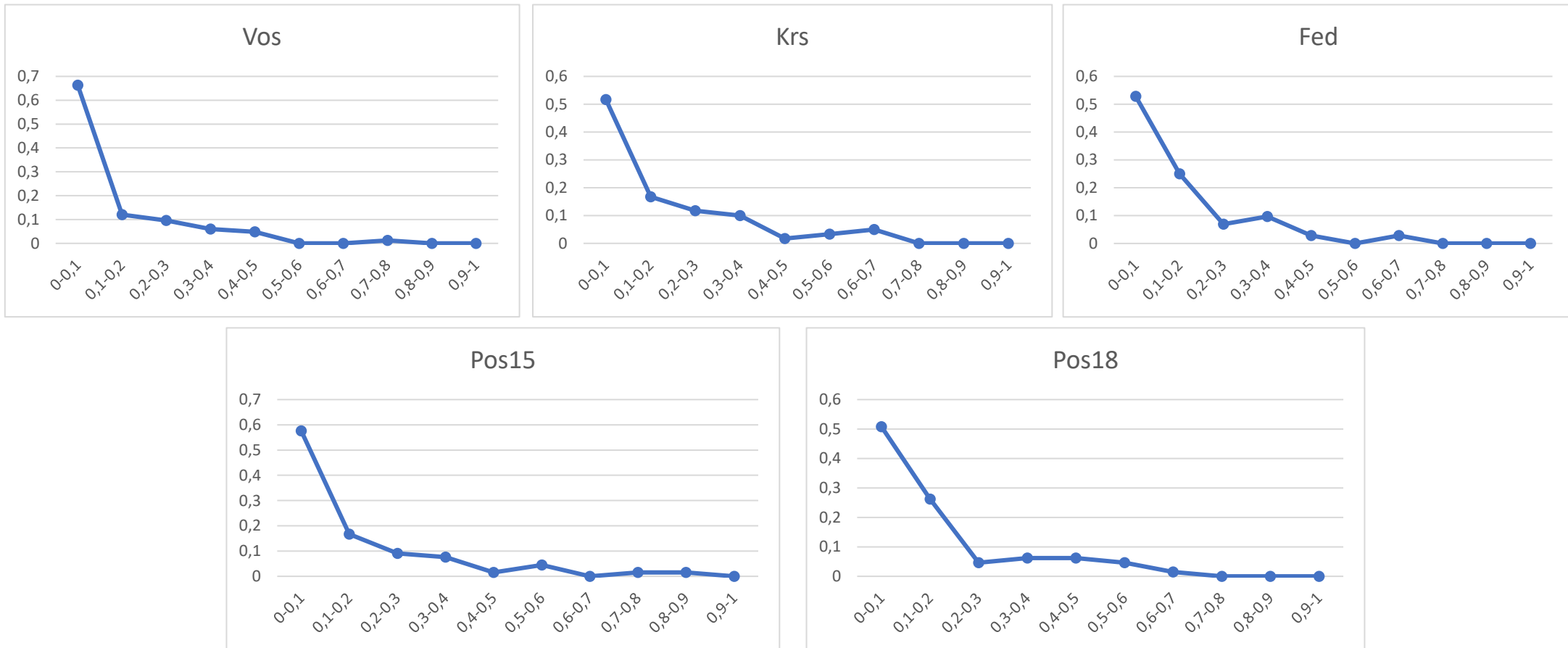


Рисунок 25 - Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в выборках *Apostichopus japonicus*, рассчитанное с помощью программы BOTTLENECK по скорректированным данным. По оси ординат – пропорции аллелей, по оси абсцисс – частоты аллелей.

3.3.2 Изучение частот аллелей в микросателлитных локусах яДНК

Анализ частот аллелей в локусах AJ20333 и AJ10675 обнаружил преобладание определенных аллелей в выборках дальневосточного трепанга, живущих в более теплой воде (тесты на нейтральность не выявили отклонения от нулевой гипотезы для локуса AJ20333, однако при определении неравновесия по сцеплению между парами локусов для всех популяций было выявлено статистически достоверное ($P < 0.001$) неравновесие в 1 паре – AJ13361 и AJ10675). Такая зависимость от температурного градиента обнаружена для двух аллелей выбранных локусов (рис. 26). При построении диаграмм взяты выборки одного года сбора.

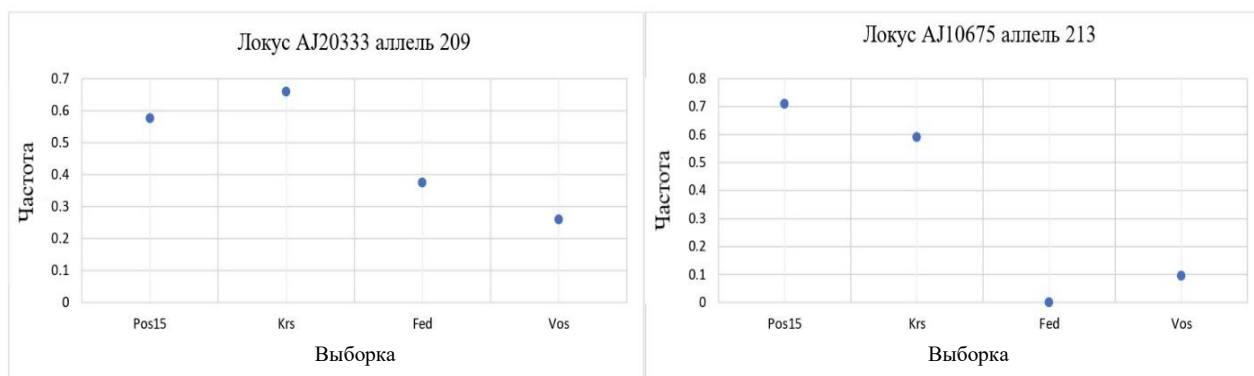


Рисунок 26 - Частоты аллелей в исследуемых микросателлитных локусах *Apostichopus japonicus* (Yagodina et al., 2022).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 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 изменения прибрежной зоны (Nehemia, Kochzius, 2017), развитие прибрежных районов (Soliman et al., 2016) вследствие высокой антропогенной нагрузки (развитая городская береговая линия) в данных локальностях, 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.

Согласно полученным данным (табл. 3), характерной особенностью изменчивости *A. japonicus* является высокое гаплотипическое разнообразие при общем низком уровне нуклеотидного разнообразия (Ягодина, Брыков, 2023). Похожая картина наблюдалась при исследовании мтДНК дальневосточного трепанга у побережья Японии (Adachi et al., 2018) и таких представителей голотурий, как *Holothuria arguinensis* (Rodrigues et al. 2015), *H. edulis* (Soliman et al., 2016), *H. atra* (Hamamoto et al., 2021). В то же время, для исследованных нами выборок число полиморфных сайтов (*S*) было ниже, чем в японской выборке (Adachi et al., 2018). В целом низкие значения нуклеотидного разнообразия и высокие значения гаплотипического разнообразия указывают на большое количество близкородственных гаплотипов. Это предполагает, что они, возможно, претерпевают интенсивные стохастические процессы на коротких временных интервалах, или же в этом участвуют также селективные процессы. Вероятно, что должны существовать факторы, определяющие высокое гаплотипическое разнообразие в разных участках ареала. В последнем случае, ввиду отсутствия возможности миграций взрослых особей, следует принимать во внимание другие причины,

обеспечивающие поток генов между местообитаниями дальневосточного трепанга.

Изучение двух выборок из одной локальности показало наличие общих гаплотипов, присутствующих только в зал. Посъета – Н13 и Н14 (табл. 3). Всего общих гаплотипов при сравнении *A. japonicus* в этом районе за три года сохранилось 7. Несмотря на то, что гаплотипический состав отличается (табл. 3), статистически значимых различий при тестировании уровня дифференциации с помощью критерия χ^2 (табл. 8) и F_{st} (табл. 4) между выборками выявлено не было. Оценка потока генов между выборками зал. Посъета составила 29.84 (табл. 8). Следовательно, по данным мтДНК, изменений в генетической структуре *A. japonicus* в данной локальности за исследуемый период не произошло.

Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA, табл. 7) и попарного F_{st} (табл. 4) не выявили существенных генетических различий между выборками из различных локальностей зал. Петра Великого. Значения F_{st} и индекс фиксации были статистически незначимы ($P > 0.05$). Для других видов голотурий эти показатели давали сходный результат. Для *Holothuria nobilis* (Uthicke, Benzie, 2003) не обнаружено значимой структуры популяции; анализ молекулярной дисперсии не выявил существенных различий между субпопуляциями *Cucumaria frondosa* в западной части Атлантики (So et al., 2011), позволяя предположить, что она составляет одну панмиктическую популяцию. Однако в некоторых исследованиях уровень генетической подразделенности был значимо выше. Например, для *Holothuria atra* (Hamamoto et al., 2021) вблизи центральных и южных островов Рюкю AMOVA выявлял высокий уровень дисперсии среди групп. Парные сравнения популяций выявили высокую степень генетической структурированности *H. edulis* на острове Окинава (Soliman et al., 2016).

Кластеризация гаплотипов мтДНК на основе стандартных генетических дистанций позволила выделить две локальные группировки, не связанные с

географической локализацией выборок. На основании кластерного анализа, гаплотипы объединялись в две группы по двум вариантам (в зависимости от принадлежности гаплотипов H4 и H13 к одному или другому кластеру). Показатели нуклеотидного разнообразия для двух гаплогрупп (табл. 11) отличались более, чем в два раза, указывая на подразделенность гаплотипов. Полученные при проведении иерархического анализа молекулярной дисперсии (табл. 10) результаты свидетельствуют о дифференциации генеалогических групп. Значительная структурированность по результатам метода AMOVA сочетается с большим процентом различий между группами и высоким разнообразием внутри самих групп. Изучение потока генов между гаплогруппами показало практически его полное отсутствие. Определение потока генов между выборками продемонстрировало интересный результат (табл. 8): существование высокого генетического потока между выборками или его отсутствие вовсе. Однако имеется одна закономерность - поток генов был равен нулю между выборками, которые кластеризовались отдельно друг от друга по данным микросателлитных локусов яДНК (рис. 18, рис. 22). Косвенное определение потока генов по микросателлитным маркерам демонстрировало небольшие его значения для описанных выше пар выборок (табл. 29). 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 (Hedgcock, Pudovkin, 2011; Watts et al., 1990). Как правило, даже морские беспозвоночные с низкой подвижностью на взрослой стадии могут по-прежнему характеризоваться высоким потоком генов, если способность к расселению высока на планктонной стадии (Palumbi, Wilson, 1990). Считается, что виды с меньшим временем расселения личинок имеют большую организованность и структуру, чем те, у которых период свободноплавающей личинки длится дольше (So et al., 2011). К примеру, высокая структурированность популяции

наблюдается у *Holothuria scabra*, время расселения личинок которой составляет 2 недели (Uthicke, Benzie, 2001). Период свободноплавающей личинки у *A. japonicus* занимает около 2-х недель (Qiu et al., 2015), этим может быть обусловлена структурированность по данным фрагмента гена *COI* мтДНК.

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). При температуре 20–21 °С можно наблюдать, как личинки *A. japonicus* впервые используют свои щупальца для прикрепления к субстрату на двенадцатый день после оплодотворения (Qiu, 2015). Наибольшая длительность такого температурного оптимума документирована для зал. Посъета (Гаврилова, Кондратьева, 2018). В Амурском зал. наблюдается тенденция к понижению температуры воды у дна, что может создать неблагоприятные условия для выживания молоди; усиление стратификации вод препятствует поступлению биогенных элементов (Зуенко, Рачков, 2015). Взвешенные отложения в естественной морской воде не всегда могут вызывать летальные повреждения личинок *A. japonicus*, поэтому это не является основной причиной их низкой выживаемости в дикой природе. Наоборот, взвесь, богатая органическим детритом и микробами, может служить дополнительным питанием для личинок и благоприятствовать (в определенной степени) их росту и расселению (Qiu et al., 2015).

В-третьих, однонаправленный ток личинок вероятен вследствие их расселения посредством течений. Если поток генов возможен во всех направлениях, то в этой ситуации невозможно предположить наличие изолированных популяций и формирования отличающихся гаплогрупп. Течение Куроисио является основным западным пограничным течением, контролируемым Северо-Тихоокеанским круговоротом. Цусимское течение – это ответвление Куроисио, переносящее теплую воду в Японское море (Gallagher et al., 2015). Это течение однозначно переносит личинки из южных

локальностей в северные, но не наоборот. Таким образом, южные локальности оказываются изолированы от северных. Изменения в мтДНК накапливаются независимо в южных и северных локальностях, формируя однонаправленную изоляцию, достаточную для формирования отличающихся гаплогрупп.

В-четвертых, формирование двух основных гаплогрупп в панмиктической популяции по стохастическим причинам является маловероятным событием (Marjoram, Donnelly, 1994). Более вероятная причина - наличие в прошлой истории вида двух популяций с ограниченным генетическим обменом. Как было показано для четырех видов рыб семейств Salmonidae и Cyprinidae в Японском и Охотском морях (Маляр, 2017), вследствие накопления преимущественно нейтральных мутаций могла произойти дивергенция гаплогрупп.

В-пятых, на гаплотипическую структуру могли повлиять большие различия в репродуктивном успехе (Hedgcock, 1982). Такие различия возникают из-за подобных тотализатору шансов 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.

Подводя итог, можно предположить, что наиболее вероятными факторами, определяющими структурированность *A. japonicus* в зал. Петра Великого, является разброс в репродуктивном успехе.

4.2 Влияние нулевых аллелей на анализ генетической изменчивости и дифференциации микросателлитных локусов яДНК

В популяционных исследованиях нулевым аллелем называют отсутствие ПЦР-продукта 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).

Проверка наличия и эффекта нуль-аллелей на различные генетические параметры с использованием определенных аналитических инструментов проводилась в некоторых исследованиях (Kalinowski, Taper, 2006; Chapuis, Estoup, 2007; Girard, 2011; Meeûs, 2018), но лишь немногие из них эмпирически проверили это влияние (Girard, Angers, 2008; Dąbrowski et al., 2015; Rico et al., 2017). Существуют работы, оценивающие воздействие нулевых аллелей путем изменения дизайна праймеров и сравнения исходных результатов с результатами «новых» праймеров, свободных от нулевых аллелей (Lemer et al., 2011).

Нулевые аллели при анализе микросателлитов были зарегистрированы для многих морских организмов: нуль-аллели обнаружены у морских игл *Cyprinodon tularosa* (Jones et al., 1998), у креветки курума *Penaeus japonicus* (Sugaya et al., 2002), у брюхоногого моллюска *Haliotis discus hannai* (Li et al., 2003). Ранее большинство авторов сообщали о них, но не проводили корректировку данных с учетом нулевых аллелей (Dakin, Avise, 2004). При исследовании морского ежа *Strongylocentrotus franciscanus* (Mccartney et al., 2004) нулевые аллели также были выявлены, подсчитана их частота, однако корректировки данных произведено не было, поэтому точно сказать, как сильно они могли повлиять на конечный результат, не представляется возможным.

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 (табл. 22). Из 10 микросателлитных локусов 4 показали наличие нулевых аллелей в разных

выборках. Примечательно, что в одной выборке нуль-аллели могут присутствовать, а в другой нет.

Используемые программы рассчитывают частоты нулевых аллелей и корректируют один или несколько статистических показателей. В программе FreeNA оценка частоты нулевых аллелей для каждого локуса и выборки проводится в соответствии с EM-алгоритмом (*expectation-maximization algorithm*) Демпстера с соавторами (Dempster et al., 1977). С применением этой программы можно не только оценивать частоту нуль-аллелей, но и корректировать F_{st} , так как было показано, что присутствие нулевых аллелей влияет на генетическую дистанцию между популяциями (Chapius, Estoup, 2007). Характерно, что значения F_{st} и генетических расстояний обычно увеличиваются с уменьшением генетического разнообразия внутри популяции (Paetkau et al., 1997). Однако для генеральной совокупности особей *A. japonicus* зал. Петра Великого нулевые аллели оказали незначительное влияние на генетические дистанции между выборками (изменения были, в основном, в третьем знаке после запятой, табл. 17, табл. 27), но оказали влияние на устойчивость топологии дендрограмм, увеличивая статистические значения бутстрэп-поддержек некоторых узлов (рис. 11, рис. 18). При Байесовской кластеризации выборок (STRUCTURE) корректировка оказывала большее влияние при применении стандартных настроек программы. Выбор оптимального количества кластеров с помощью методов Эванно и Притчарда (рис. 13, рис. 20) давал разные результаты при корректировке и без нее, но влияние на статистический анализ с помощью максимума и медианы средних не оказывал (рис. 14, рис. 21).

MICRO-CHECKER рассчитывает частоту нулевых аллелей, используя методы, описанные Чакраборти с соавторами (Chakraborty et al., 1992), Брукфилдом (Brookfield, 1996) с применением двух уравнений и Ван Остерхоутом (Van Oosterhout et al., 2004). Особенностью программы является корректировка генотипов после обнаружения нулевых аллелей. Причем

пользователь самостоятельно может выбрать метод оценки нуль-аллелей, с помощью которого будет произведено исправление генотипов. В MICRO-CHECKER по полученным данным (табл. 22) нулевые аллели были определены в случаях, когда величины наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности значительно отличались (для локусов AJ20333 в выборках зал. Восток, б. Федорова; AJ13361 – в выборке зал. Посъета_2018, Psj1828 - в выборке с м. Красный, и зал. Посъета_2018; 3S16 для выборки зал. Восток).

Присутствие нулевых аллелей приводило к большим расхождениям между H_o и H_e , также величина коэффициента инбридинга становилась выше, а индекс Шеннона уменьшался (табл. 26). 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.

В целом присутствие нулевых аллелей в полтора раза снижало значение наблюдаемой гетерозиготности и вело к отклонению от равновесия Харди-Вайнберга (табл. 26). При сравнении коэффициентов инбридинга для средних значений генетической изменчивости с корректировкой по нуль-аллелям и без нее данные с исправленными генотипами давали меньшие величины, более приближенные к нулю. Наиболее это выражено для локуса 3S16 в выборке зал. Восток - F_{is} без учета нулевых аллелей составлял 0.529, после корректировки генотипов F_{is} был равен 0.265.

При исследовании популяций дальневосточного трепанга Канно с коллегами (Kanno et al., 2006) также столкнулись с наличием нулевых аллелей в разных микросателлитных локусах. Они скорректировали частоты аллелей во избежание статистических ошибок, однако большинство результатов не

отличались между собой до и после коррекции из-за большого количества локусов, использованных в этом исследовании.

Таким образом, на сегодняшний день проблема нулевых аллелей решается разными способами: меняется дизайн праймеров (Wu et al., 2019), корректируются частоты аллелей и генотипов на основе предполагаемых частот нулевых аллелей (Chapius, Estoup, 2007), выбираются наиболее подходящие статистические методы и программы для определения нуль-аллелей (Campragne 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.

4.3 Генетическое разнообразие *Apostichopus japonicus* зал. Петра Великого по данным микросателлитных локусов яДНК

Микросателлиты характеризуются высоким уровнем полиморфизма, что обусловлено высокой скоростью мутаций, поэтому их удобно использовать при исследовании популяционной структуры и генетического разнообразия (Selkoe, Toonen, 2006). В проводимом исследовании всего было обнаружено 108 аллелей по всем микросателлитным локусам для пяти выборок дальневосточного трепанга. Большое число аллелей на локус было выявлено также и в других исследованиях *A. japonicus* (Kanno et al., 2006; Chen et al., 2013).

Аллельное богатство представляет собой число различных типов аллелей в выборке (популяции) вне зависимости от частоты встречаемости (Животовский, 2021). Это мера генетического разнообразия, показывающая долгосрочный потенциал популяции к устойчивости. A_r используется реже, чем гетерозиготность, отчасти потому, что математически сложнее учесть

стохастический процесс генетического дрейфа для аллельного богатства (Greenbaum et al., 2014). В популяции должна присутствовать достаточная гетерозиготность, чтобы обеспечить краткосрочный успех вида для выживания в дикой природе, однако аллельное богатство важно для повышения шансов на долгосрочное выживание (Allendorf, 1986). В проводимом исследовании среднее значение аллельного богатства для всех выборок и локусов составило 6.339 ± 0.540 (табл.16), что меньше, чем для *A. japonicus*, изученном на побережье Южной Кореи и Китая (A_r для каждого локуса во всех выборках варьировало от 8.58 до 11.38, Kang et al., 2011), и дальневосточного трепанга с побережья Южной Кореи (общий A_r для всех популяций и локусов - 9.580, Kim et al., 2008). Полученное значение аллельного богатства наиболее приближенно к такому у *A. japonicus*, описанного в работе Солимана и др. (Soliman et al., 2012): A_r для всех популяций с зал. Тояма (Япония) составило 7.65.

Известно, что аллельное богатство более чувствительно, чем гетерозиготность, к расширению популяции (Leberg, 1992), поскольку A_r учитывает не обилие аллелей, а только их присутствие. Аллельное богатство в этом случае в большей степени свидетельствует об эволюционном потенциале популяции в долгосрочной перспективе, так как величина и направление отбора определяются исходным аллельным составом (Caballero, Garcia-Dorado, 2013). Поток генов является силой, которая может восстановить A_r , а дрейф генов может привести к потере аллелей, и его также необходимо учитывать (Ласу, 1987). Принимая во внимание оценки аллельного богатства для выборок *A. japonicus* из зал. Петра Великого (табл. 15), можно предположить, что большее влияние на A_r оказывает дрейф генов.

Значения наблюдаемой гетерозиготности практически в каждом локусе для каждой группы особей были меньше ожидаемой. Среднее значение H_o для всех выборок и локусов составило 0.525 ± 0.038 , $H_e = 0.699 \pm 0.034$ (с учетом нулевых аллелей, табл. 26). В других работах по дальневосточному трепангу

Ho также была меньше *He* ($Ho = 0.537$, $He = 0.634$, Kanno et al., 2006), хотя выборки были взяты из разных локальностей Японского моря и Тихого океана. В работе Чанга с соавторами (Chang et al., 2009) для выборки *A. japonicus* с Дальнего Востока России $Ho = 0.347$, $He = 0.654$ по всем локусам, причем среднее число аллелей на локус было идентично полученным в данном исследовании. В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2008) $Ho = 0.576$, $He = 0.761$, что авторы связывают с недостатком гетерозигот.

Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было обнаружено для каждого локуса (табл. 16, табл. 26). В некоторых работах (Kim et al., 2008; An et al., 2013) были использованы те же микросателлитные маркеры (Psj2409, Psj2464, Psj2889 – Kanno et al., 2005), что и в нашей работе (табл. 2). Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга для особей с побережья Южной Кореи в исследуемых локусах совпадали с полученными в исследовании значениями, *Ho* была ниже *He* (Kim et al., 2008); для дикой популяции с побережья Южной Кореи (An et al., 2013) в локусе Psj2889 наблюдаемая гетерозиготность также была меньше ожидаемой. В работе по исследованию популяционной структуры дальневосточного трепанга на побережье Южной Кореи (Kim et al., 2008) 8 из 9 локусов демонстрировали отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. При изучении особей *A. japonicus*, взятых с побережья Японии, Южной Кореи, Китая и Дальнего Востока России, Чанг с соавторами (Chang et al., 2009) указывают, что в 85% случаев для выбранных локусов наблюдалось отклонение от равновесия. В работе 2013 года южнокорейских ученых (An et al., 2013) для дикой популяции дальневосточного трепанга показана та же ситуация с отклонением от равновесия Харди-Вайнберга по выбранным маркерам.

Коэффициент инбридинга для всех выборок и локусов составил 0.251 ± 0.041 (табл. 26), что ниже, чем для группы особей из Владивостока в работе Чанга и др. (Chang et al., 2009), где $F_{is} = 0.523$ и выборки бухты Тояма, где $F_{is} = 0.347$ (Soliman et al., 2012), и приблизительно равен коэффициенту

инбридинга для особей *A. japonicus* с побережья Южной Кореи (Kim et al., 2008, $F_{is}=0.260$). Во всех исследуемых выборках зал. Петра Великого значения F_{is} были выше нуля (табл. 26), что согласуется с данными H_o и H_e .

Чанг с коллегами (Chang et al., 2009) потенциальными причинами отличия в значениях наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности по отклоняемым от равновесия Харди-Вайнберга локусам называют эффект Валунда, наличие нулевых аллелей и выпуск в акватории искусственно выращенного дальневосточного трепанга. Ан с соавторами (An et al., 2013) дефицит гетерозигот для дикой популяции *A. japonicus* предполагают в связи с такими факторами, как наличие нераспознанных нулевых аллелей, естественный отбор, действующий на генетические маркеры, близкородственное скрещивание, возможный эффект Валунда, а также сочетанием этих причин. В работе 2008 года (Chen, Yang, 2008) значительные отклонения от равновесия Харди-Вайнберга для дикой популяции *A. japonicus* авторы связывают с большим количеством нулевых аллелей, что частично объясняет недостаток гетерозигот в указанной статье.

На основании собственных и литературных данных можно говорить о небольшом дефиците гетерозигот для популяций дальневосточного трепанга Японского моря, что может быть вызвано несколькими причинами: наличием нулевых аллелей (эту причину в своем исследовании мы скорректировали), антропогенными факторами вследствие искусственного разведения, когда ограниченное число особей используется для воспроизводства; близкородственным скрещиванием или эффектом Валунда (Addison, Hart, 2004) из-за нарушения панмиксии за счет наличия мелких неравных по численности субпопуляций, в пределах которых происходит постоянный инбридинг. Отбор может привести к дефициту гетерозигот (Zouros, Foltz, 1984), но маловероятно, что он объясняет высокие коэффициенты инбридинга, обнаруженные в локусах у дальневосточного трепанга.

Одной из причин снижения генетического разнообразия *A. japonicus* можно назвать его поедание водорослевым крабом *Pugettia ferox* (Ohtsuchi, Kawamura, 2019). Этот краб распространен в том числе и в водах зал. Петра Великого (Виноградов, 1950). В недавнем исследовании (Inaba et al., 2021) были получены убедительные доказательства того, что смертность от хищничества *P. ferox* на коммерчески важных *A. japonicus* может быть значительной, вызывая высокую смертность на ранней стадии жизни в естественной среде, особенно в районах, выпускающих молодь заводского производства.

Другой причиной дефицита гетерозигот может быть инбридинг. 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). При снижении численности особей в акваториях уменьшается и эффективный размер популяции. В этом случае поиск партнеров для размножения затруднен, следствием чего и будет повышение уровня инбридинга.

Альтернативное объяснение высокого коэффициента инбридинга основано на гипотезе о том, что у популяций морских свободноживущих организмов наблюдается большой разброс в репродуктивном успехе (Hedgcock, Pudovkin, 2011). 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. Два основных прогноза этой модели заключаются в том, что: (1) группы должны быть генетически дифференцированы друг от друга, и (2) каждая из них должна иметь уменьшенное аллельное разнообразие, потому что лишь немногие взрослые особи в популяции внесли успешный вклад в результирующий пул потомства (Hedgcock, 1994). Поскольку выборки, отобранные в исследовании, генетически неоднородны, мы предполагаем, что полученные результаты согласуются с гипотезой о том, что большой дефицит гетерозигот является результатом временного эффекта Валунда, вызванного большой разницей в репродуктивном успехе. Подтверждающим доказательством этого аргумента является наблюдение мелкомасштабной генетической дифференциации между географически близкими субпопуляциями в панмиктической популяции.

4.4 Популяционно-генетическая структура *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК

Популяционно-генетическая теория предсказывает, что виды с планктонными личинками демонстрируют высокую рассредоточенность и, следовательно, низкую генетическую структуру (Chust et al., 2016). Например, Келли и Палумби (Kelly, Palumbi, 2010) проанализировали набор данных о видах тихоокеанских прибрежных беспозвоночных, чтобы определить наиболее влиятельные структурирующие факторы вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки. В частности, в результате проведенного скрининга данных *COI* мтДНК из популяций 50 видов морских беспозвоночных, отобранных в четырех прибрежных районах Калифорнии, Орегона и Аляски, были выявлены девять видов с непелагическим развитием и высоким уровнем генетической структуры. Из 41 вида с пелагическим развитием только 13 показали значительную генетическую подразделенность (Kelly, Palumbi, 2010). В разных регионах сильная генетическая дифференциация происходит чаще, чем ожидалось, у видов со средней и

высокой приливной зоной, что может отражать уменьшение потока генов из-за естественного отбора вдоль прибрежных экологических градиентов.

Данные по анализу микросателлитных локусов дальневосточного трепанга из 4 локаций зал. Петра Великого выявили генетическую дифференциацию между выборками (табл. 27). Для *A. japonicus* с побережья Южной Кореи (Kim et al., 2008) показатели F_{st} были ниже, чем для исследованных выборок, но авторы также утверждают, что популяции кластеризуются на несколько групп. В работе по изучению *A. japonicus* в бухте Тояма (Soliman et al., 2012) значения F_{st} между выборками были схожи с полученными в работе.

Гетерогенность выборок определяется наличием уникальных аллелей, присутствующих в каждой выборке. Среднее число уникальных аллелей для всех выборок составляет 0.500 ± 0.095 (табл. 16), что ниже, чем в работе Кима с соавторами (Kim et al., 2008) - 0.78.

В целом для выборок дальневосточного трепанга Японского моря (Chang et al., 2009; Soliman et al., 2012) при построении деревьев демонстрировалась кластеризация в зависимости от географического положения выборок, что не характерно для полученных нами данных.

Иерархический анализ молекулярной дисперсии выявил высокий процент изменчивости среди особей внутри выборок и на индивидуальном уровне ($P < 0.05$, табл. 30) при разных вариантах группировки выборок. Полученные данные не отвергают дифференциацию выборок, но объясняют значения F_{st} , не превышающие порог 0.15 для значительной дифференциации (Frankham et al., 2002).

Анализ в программе STRUCTURE проводился с помощью стандартных настроек и расширенных для сравнения полученных результатов. Модель LocPrior (Hubisz et al., 2009) использует места выборки в качестве априорной информации для облегчения кластеризации при слабой структурированности популяций. К свойствам этой модели относится то, что она не склонна

обнаруживать гетерогенность, когда ее нет, а также может игнорировать информацию об отборе проб, когда происхождение особей не коррелирует с местами сбора.

Количество прогонов также играет важную роль в вычислительном анализе, как и повторные независимые прогоны, поскольку они ограничивают влияние стохастичности и увеличивают точность оценок сводной статистики, встроенной в саму программу, что особенно необходимо при использовании метода Эванно (Gilbert et al., 2012).

Несбалансированные по числу особей выборки оказывают большое влияние на анализ в STRUCTURE (Neophytou, 2014). Это снижает точность как метода Эванно, так и метода логарифмического правдоподобия апостериорных вероятностей Притчарда (Pritchard et al., 2000). Данный эффект нельзя устранить, используя больше маркеров, однако его можно преодолеть, сочетая альтернативный априорный анализ, где значение $\alpha \approx 1/K$, а также модель независимых аллелей (Wang, 2017). В таком случае программа выдает достаточно хорошие оценки числа кластеров при неодинаковых по размеру выборках и небольших числах K .

Оптимальное число кластеров, определяемое методом Эванно, практически всегда было разным (рис. 13А, рис. 20А). Данная проблема была описана несколькими авторами (Janes et al., 2017; Wang, 2017). Даже с репрезентативным количеством маркеров ΔK часто оценивает оптимальное число кластеров, равное двум, как верхний уровень иерархической структуры, что ведет к ее недооценке. Авторы программы признают, что это случайное приближение, и советуют исследователям выбирать наиболее разумное значение с точки зрения биологии. Присущая сложность Байесовских вычислений была названа одной из причин такой проблемы. Увеличение скорости потока генов между популяциями, близкородственное скрещивание, небольшое количество особей или локусов также может оказывать влияние (Waples, Gaggiotti, 2006; von Holdt et al., 2010; Rodriguez-Ramilo, Wang, 2012). Кроме того, неравномерность выборок может еще больше исказить результат,

особенно если пользователи настраивают параметры по умолчанию (Puechmaille, 2016).

Очевидно, что на определение оптимального количества кластеров могут влиять и ошибки генотипирования, в том числе и нулевые аллели, так как до корректировки генотипов показатель ΔK имел большие значения для разного числа K (рис. 13А). После коррекции нулевых аллелей число кластеров определялось равным двум (рис. 20А), отражая только верхний уровень иерархической структуры, что подтверждается дендрограммой (рис. 18А).

Так как представленные в данной работе выборки неравны по числу особей, помимо расширенных настроек самой программы STRUCTURE была использована альтернативная статистика для подсчета оптимального количества кластеров (Puechmaille, 2016). В статье показано (Puechmaille, 2016), что субпопуляции с уменьшенной выборкой имели тенденцию к слиянию, в то время как субпопуляции с большим количеством особей были разделены, несмотря на принадлежность к одной и той же панмиктической популяции. Разработанные автором методы максимума средних/медиан и медианы средних/медиан применимы в случае предварительного знания о местах сбора проб. Среди новых алгоритмов, те, которые основаны на медиане, были менее чувствительны, чем те, которые построены на максимуме. Для выборок дальневосточного трепанга оптимальное количество кластеров всегда равнялось трем, когда мы предварительно закладывали информацию о месте сбора проб, и это согласуется с гистограммами STRUCTURE и CLUMPAK (рис. 19, рис. 22).

По результатам анализа генетической кластеризации выявлена дифференциация между выборками дальневосточного трепанга. Однако вместо того, чтобы сосредотачиваться на интерпретации результатов генетической кластеризации (в любом виде, включая Байесовскую кластеризацию) как изолированных «популяций», возможно, следует больше сосредоточиться на причинах, вызвавших гетерогенность (Astle, Balding 2009;

Funk et al., 2012; Janes et al., 2017), что особенно важно для изучения популяционной структуры морских беспозвоночных со свободноплавающей личинкой. Биология вида *A. japonicus* не предполагает наличие 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, обмен личинками *A. japonicus* возможен посредством течений. Во-вторых, во всех этих локальностях расположены морские порты. Занесение личинок из одних местообитаний *A. japonicus* в другие возможно с балластными водами.

В-третьих, фактором, определяющим высокий уровень гетерогенности, может быть отличающееся давление отбора по локусам количественных признаков и сцепленными с ними микросателлитами. Часть микросателлитных маркеров может находиться под действием фонового отбора или хичхайкинга (Тетерина, 2016). Когда возникает благоприятная мутация в функциональном локусе и происходит ее фиксация в популяции, она дает случайное преимущество всем генам, с которыми первоначально была связана. Мейнард Смит и Хэй (Maynard Smith, Haigh, 1974) назвали этот процесс «генетическим автостопом» или «хичхайкингом» и показали, что в больших популяциях он может уменьшить нейтральное разнообразие в гораздо большей степени, чем случайный генетический дрейф (Barton, 2000). При этом соседние с геном полиморфные локусы (даже нейтральные), находящиеся в неравновесном сцеплении, будут иметь тенденцию изменять частоту своих аллелей. Физический размер попутного фрагмента будет зависеть от коэффициента отбора благоприятной мутации и от скорости локальной рекомбинации; сильный отбор и низкая рекомбинация увеличат размер затронутых областей (Edelstein et al., 2006). Следовательно, автостоп увеличивает корреляцию уровней разнообразия между связанными локусами и создает локальную асимметрию в частотном спектре (Tajima, 1989b).

Направленный отбор может также усиливать генетическую дифференциацию между популяциями в выбранных локусах и соседних областях генома (Lewontin, Krakauer, 1973).

Изучение частот аллелей в микросателлитных локусах AJ20333 и AJ10675 (рис. 26) выявило преобладание определенных аллелей для выборок, собранных в более теплой воде. Исследования показали (Лучин и др., 2005; Гаврилова, 2013; Гаврилова, Кондратьева, 2018), что в зал. Посъета температура воды в период размножения дальневосточного трепанга на 4-5 градусов выше, чем в зал. Восток; выборки из Амурского зал. (м. Красный и б. Федорова) представляют собой промежуточный вариант между зал. Посъета и зал. Восток. Возможно, что данные локусы находятся в сцеплении с локусами количественных признаков, определяющих выживаемость личинок в абиотических факторах среды.

Однако надежное обнаружение отбора остается сложной задачей (Li et al., 2010). Как следствие, был разработан широкий спектр методов для сведения к минимуму ложноположительных результатов, вызванных различиями в скорости мутаций и/или рекомбинаций между локусами или общегеномными эффектами на изменчивость из-за расширения или сокращения размера популяции, дизайна выборки, структуры популяции и т.д.

Поскольку выявление локусов-выбросов при сканировании генома в настоящее время зависит от статистических тестов, одной из основных задач является выделение действительно значимых локусов при минимизации обнаружения ложноположительных результатов. Результаты, полученные с помощью двух методов (табл. 14, табл. 15), не полностью согласованы, возможно, из-за разницы в статистической мощности с использованием нескольких показателей изменчивости, каждый из которых измеряет разные параметры и основан на разных предположениях.

Локус AJ10675 продемонстрировал более высокую дифференциацию, чем ожидалось, предполагая, что на него могло повлиять действие дисруптивного отбора среди однородных выборок. Напротив, локус Psj2889

демонстрирует более низкую генетическую дифференциацию, чем ожидалось, что может представлять признаки очищающего и/или уравнивающего отбора внутри выборок. Кроме того, отбор не является единственной возможностью изменения распределения изменчивости в определенных локусах, уменьшение изменчивости или усиление дифференциации может быть результатом только случайности, например генетического дрейфа (Kane, Rieseberg, 2007).

В эпоху геномики изучение адаптации у немодельных видов опирается главным образом на использование нейтральных маркеров для определения действия отбора на сцепленные локусы (Bierne, 2010). Хотя были разработаны статистические тесты для выявления локусов, демонстрирующих большую или меньшую популяционную дифференциацию (в отличие от нейтральности), точная форма отбора почти никогда не рассматривалась (Faure et al., 2008). С недавнего времени используется несколько разных подходов: измерение уровня полиморфизма ДНК для большого числа локусов в масштабе всего генома в популяциях, а также секвенирование полиморфизмов фланкирующих областей. Эти подходы могут оценить также силу отбора и приблизительное местоположение полезной мутации в геноме (Pavlidis et al., 2008). Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы выявить возможный отбор этих маркеров.

В-четвертых, так как при исключении локусов-кандидатов, отклоняющихся от гипотезы нейтральности, гетерогенность между выборками *A. japonicus* все равно была выявлена (рис. 23, рис. 24), она может определяться разбросом в репродуктивном успехе, при котором в определенной локальности оседают личинки, происходящие от немногих особей-производителей (Hedgcock, Pudovkin, 2011). Известно, что этот эффект актуален для морских видов с высокой плодовитостью и высокой ранней смертностью (Flowers et al., 2002; Taris et al., 2009; Barry et al., 2022). У таких организмов эффективный размер популяции может быть значительно меньше общего размера популяции. При этом относительно небольшое

количество особей на популяцию размножается в каждом цикле, а различия в репродуктивном успехе между особями могут быть высокими из-за стохастических факторов (Hedgcock, Sly, 1990; Hedgcock et al., 2007).

Полученные нами данные позволяют предполагать, что на дифференциацию выборок *A. japonicus* наибольшее влияние оказывает разброс в репродуктивном успехе.

4.5 Демографическая история *Apostichopus japonicus* в исследуемом ареале

4.5.1 Демографическая история *Apostichopus japonicus* по данным мтДНК

В работе было проведено тестирование на нейтральность мтДНК с использованием показателей Таджимы (D) и Фу (F_s). Отрицательное значение F_s (табл. 9, табл. 12) свидетельствует об избыточном количестве аллелей. Отрицательный показатель D (табл. 9, табл. 12) означает избыток низкочастотных полиморфизмов по сравнению с ожидаемыми вследствие демографической экспансии после прохождения «горлышка бутылки». Однако ни одна из величин тестов на нейтральность не была статистически поддержана ($P > 0.05$). Поскольку многие генетические оценки популяции относительно нечувствительны к слабому отбору (Skillings et al., 2014), нет никаких доказательств того, что не селективные процессы ответственны за модель разнообразия гаплотипов *COI* мтДНК, представленную здесь.

Анализ распределения числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК для всех выборок (рис. 8) и каждой выборки по отдельности (рис. 9) продемонстрировал мультимодальность. Мультимодальность наблюдалась и при кластеризации гаплотипов по двум вариантам группировки (рис. 10). Полученный результат свидетельствует о демографическом равновесии или стабильной популяции с одной стороны (Ray et al., 2003), но, с другой стороны, мультимодальное (включая

бимодальное) распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) может также указывать на то, что популяция находится под влиянием миграции, разделена и/или претерпела историческое сокращение (Marjoram, Donnelly, 1994; Bertorelle, Slatkin, 1995; Rogers, Harpending, 1992; Rogers et al., 1995). Однако основные пики наблюдаемых частот приходятся на 6-7 нуклеотидных замен для каждой выборки (рис. 9), для гаплогрупп основным пиком является 3 нуклеотидные замены (рис. 10), но 6-7 нуклеотидные замены также присутствуют. Следовательно, *A. japonicus* в изучаемом ареале постоянно существует и сохраняет гаплотипы с высоким уровнем различий. В данном случае мультимодальность указывает именно на стабильно существующую популяцию, не подверженную резкому сокращению или увеличению числа особей. Последнее подтверждается показателями индекса неоднородности (r) и суммой квадратов отклонений (SSD , табл. 9, табл. 12). Все значения r и SSD отклоняли нулевую гипотезу о демографической экспансии ($P < 0.05$), что указывает на то, что данные не соответствуют этой модели (Harpending, 1994).

4.5.2 Демографическая история *Apostichopus japonicus* по данным микросателлитных локусов ядерной ДНК

В данном исследовании нулевые аллели не оказали значительного влияния на тестирование, примененное в программе BOTTLENECK (Piry et al., 1999) для определения прохождением выборками *A. japonicus* «бутылочного горлышка».

Тесты, использованные в работе, основаны на свойстве уменьшения эффективного размера популяций, в которых развивается временный избыток гетерозиготности. В данном случае избыток гетерозиготности – это сравнение наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в смысле генного разнообразия (Nei, 1977); избыток гетерозигот же сравнивает их количество с ожиданием равновесия Харди-Вайнберга.

Для селективно нейтральных локусов число аллелей и частотное распределение в естественных популяциях являются результатом равновесия между мутациями и генетическим дрейфом. Параметрами этого равновесия являются частота мутаций и эффективный размер популяции. Когда популяция проходит через «горлышко бутылки» и ее эффективный размер уменьшается, это вызывает снижение количества аллелей и гетерозиготности. Следовательно, имеет место временный дефицит числа аллелей, обнаруживаемых в выборке. Величина дефицита аллеля увеличивается со временем, достигает максимума, затем асимптотически уменьшается до нуля, что соответствует новому равновесию мутации-дрейфа. Чтобы проверить, существует ли аллельный дефицит, необходимо определить взаимосвязь между наблюдаемой гетерозиготностью и гетерозиготностью, ожидаемой от наблюдаемого количества аллелей. Популяции, демонстрирующие значительный избыток гетерозиготности, будут рассматриваться как недавно прошедшие через «горлышко бутылки» (Cornuet, Luikart, 1996).

Для выборок дальневосточного трепанга (табл. 31) нулевая гипотеза о равновесии мутации-дрейфа была отклонена (после корректировки нулевых аллелей) при использовании моделей мутации IAM, TPM и SMM. Генетические тесты «горлышка бутылки» требуют предположений об 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). Следовательно, при определении прохождения выборками *A. japonicus* «горлышка бутылки» мы больше опираемся на модель TPM. 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 *A. japonicus* «бутылочного горлышка» на исследуемой территории, случившееся в недавнем прошлом (отклонение от равновесия мутации-дрейфа, вероятно, можно выявить в течение 25–250 поколений после начала сокращения популяции (Gaur et al., 2010), обнаружено по исследуемым микросателлитным локусам. Учет только селективно нейтральных локусов не изменил результат (табл. 32).

Четвертый тест, используемый для проверки прохождения через «горлышко бутылки», — L-распределение частот аллелей. Это качественный метод оценки (Luikart et al., 1998). Ожидается, что популяции, которые близки к равновесию мутации-дрейфа, будут иметь большую долю аллелей с низкой частотой. Графики, построенные таким образом для 5 выборок дальневосточного трепанга (рис. 25), не демонстрируют искаженного распределения частот аллелей, скорее наблюдается нормальное L-образное распределение, что предполагает отсутствие снижения эффективного размера популяции.

4.6 Сравнение митохондриальных и микросателлитных маркеров при изучении дифференциации между выборками *Apostichopus japonicus*

При изучении генетического разнообразия и популяционной структуры *A. japonicus* зал. Петра Великого были использованы разные типы молекулярных маркеров. Если по результатам анализа микросателлитов мы определяем наличие гетерогенности выборок дальневосточного трепанга, то применение 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). Причем в некоторых исследованиях митохондриальные маркеры показывали более высокий

уровень гетерогенности выборок (Weng et al., 2013; Hui et al., 2016; Choi et al., 2021), чем микросателлиты. Частично авторы объясняют это тем, что процессы дифференциации популяций протекают быстрее в митохондриальной ДНК из-за того, что эффективный размер популяции составляет $\frac{1}{4}$ от ядерного генома (Moore, 1995). Другая вероятная причина – низкая разрешающая способность микросателлитных локусов, применяемых в анализе (Choi et al., 2021).

В некоторых экспериментах, напротив, микросателлиты демонстрируют более высокую разрешающую способность при сравнении популяций в отличие от мтДНК (Patton et al., 1997; Brunner et al., 1998; Baric et al., 2005; Fratini et al., 2016; Yujiao et al., 2022). Авторы объясняют полученные результаты различием в способах наследования митохондриальной и ядерной ДНК (Baric et al., 2005), более высокой скоростью мутаций микросателлитов, следовательно, лучшим представлением о новых эволюционных событиях (Yujiao et al., 2022).

У большинства морских беспозвоночных есть планктонные личинки и, следовательно, потенциально широкое расселение, так что генетическое единообразие должно быть общим (при предполагаемом отсутствии барьеров для расселения, Graves, 1998). Однако филогеографические исследования показывают, что панмиксия в морской среде встречается редко, что и выявляется при помощи микросателлитных маркеров даже без географической привязки (Fratini et al., 2016).

Эмпирические (Eble et al., 2011) и теоретические (Larsson et al., 2009) эксперименты 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).

В данном исследовании микросателлитные локусы выявили гетерогенность выборок дальневосточного трепанга, не связанную с географической удаленностью различных локальностей. Вызвано это может быть так называемой хаотичной мозаичностью (Johnson, Black, 1982; Hellberg et al., 2002) вследствие различия в репродуктивном успехе особей-производителей. Примечательно, что при изучении морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в зал. Петра Великого (Zaslavskaya et al., 2012) с помощью аллозимных маркеров выявлена хаотически мозаичная гетерогенность популяций. Авторы не исключают полностью факторы отбора (в том числе действующие уже после расселения личинок), но превалирующей является гипотеза разброса репродуктивного успеха (Hedgcock, Pudovkin, 2011) для *S. intermedius*. С использованием методов популяционной геномики было подтверждено действие такого «тотализатора» для антарктических блюдечек *Nacella concinna* (Vendrami et al., 2021), для кораллов *Acropora hyacinthus* (Barfield et al., 2022). При помощи микросателлитных локусов была обнаружена генетическая дифференциация на небольших географических расстояниях омара *Panulirus cygnus* (Kennington et al., 2013), которую авторы связывают с различиями в репродуктивном успехе, так же, как и для устрицы *Crassostrea virginica* (Batchelor, 2021).

Изучение фрагмента гена *COI* мтДНК не выявило гетерогенности выборок дальневосточного трепанга. Отсутствие генетической дифференциации было документировано для других видов со свободноплавающими личинками: для морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (Flowers et al., 2002), голотурии *Cucumaria miniata* (Arndt, Smith, 1998) по маркерам мтДНК. В некоторых исследованиях наблюдалась структурированность популяций по мтДНК: у креветки *Crangon crangon* было обнаружено 4 основные филогруппы по географической подразделенности (Luttikhuisen et al., 2008), у *Holothuria mammata* также были обнаружены генетические разрывы между географически отдаленными популяциями (Borrero-Perez et al., 2011). В данном случае выборки *A. japonicus* в зал. Петра

Великого между собой не были дифференцированы, однако анализ фенограмм и гаплотипической сети позволил обнаружить 2 основные гаплогруппы, позволяя обсуждать возможные причины такой подразделенности.

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 факторов, включающих генетическое разнообразие, генетически эффективный размер популяции, скорость мутаций и миграции, а также рассредоточение по половому признаку (Karl et al., 2012). В типичных условиях продолжающейся дивергенции популяции мтДНК всегда обладает большей способностью обнаруживать дивергенцию популяции, чем любой одиночный ядерный локус. Однако до недавнего времени считалось (Larsson et al., 2009), что два или более полиморфных ядерных локуса будут более чувствительными, чем мтДНК.

Очевидно, что ни один класс маркеров не является априори более чувствительным (т. е. лучше способным обнаруживать популяционную дифференциацию и структуру) во всех условиях. Ясно, что 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

В настоящем исследовании на основе изменчивости фрагмента гена *COI* мтДНК реконструирована генеалогия митохондриальных гаплотипов и проведен анализ современной популяционно-генетической структуры *A. japonicus* в акватории зал. Петра Великого Японского моря. Согласно полученным данным характерной особенностью изменчивости *A. japonicus* является высокое гаплотипическое разнообразие при общем низком уровне нуклеотидного разнообразия. 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 демонстрировала очень низкие значения, связанные, вероятно, с генетическим пулом новых особей и разбросом в репродуктивном успехе (Watts et al., 1990; Hedgecock, Pudovkin, 2011).

Интересным в данном исследовании представляется небольшая генеалогическая глубина генеалогической сети гаплотипов. Это явление может быть обусловлено несколькими причинами. Вероятны стохастические факторы, влияющие на некоторую селективность по отношению к гаплотипам. Можно предположить, что в определенном регионе оседают личинки от немногих производителей, и эта вероятность увеличивается во времени как следствие снижения численности. На это могут оказывать влияние такие факторы, как эпизоотии *A. japonicus* в этом регионе, наблюдавшиеся в 2005-2010 гг. (Терехова, Белькова, 2016). Эпизоотии способны приводить к быстрым сменам пула взрослых производителей и вариациям гаплотипического набора. Другой немаловажный фактор - температура воды в период размножения. Еще одним фактором остается нелегальный вылов дальневосточного трепанга в исследуемой акватории. Показано, что численность вида, начиная с конца 1990-х годов, в этом регионе снизилась более чем в 20 раз (Лысенко и др., 2018).

Генетическое разнообразие *A. japonicus* было изучено с использованием десяти микросателлитных локусов. Среднее значение наблюдаемой гетерозиготности для всех выборок и локусов было 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, что может быть вызвано несколькими причинами: инбридингом из-за неконтролируемого вылова, а также возможным разбросом в репродуктивном успехе.

Результаты по изучению генетической дифференциации между выборками *A. japonicus* 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. Такие различия репродуктивного успеха могут ограничивать разнообразие молодежи (Hedgcock, 1986; Hedgcock, Pudovkin, 2011) и уменьшать наблюдаемый генетически эффективный размер популяции (Palumbi, Wilson, 1990). Хотя морские виды обладают прекрасной адаптацией к размножению (Morgan, 1995), они могут быть неспособны эволюционно реагировать на точечные океанографические вариации, влияющие на репродуктивный успех.

Анализ микросателлитных локусов яДНК в пяти выборках *A. japonicus* показал, что нуль-аллели влияют на интерпретацию результатов и дальнейшее применение полученных данных возможно только после их корректировки, в

том числе с использованием статистических методов. Эти методы исследования нуль-аллелей позволяет существенно уточнить и исправить полученные результаты, что приводит к более точной интерпретации популяционных данных. Такое решение может быть наиболее целесообразно при исследовании видов с ограниченным числом доступных микросателлитных маркеров и/или, что более важно, с высокой частотой нулевых аллелей, возможно, из-за большого размера популяции (Charpius, Estoup, 2007).

Применение двух типов молекулярных маркеров позволяет получить более полную картину популяционно-генетической структуры вида. Дифференциация – это обычное явление для любой популяции, происходящее из стохастической природы генетических процессов. В данном случае микросателлитные локусы яДНК реагируют на эти явления в большей степени, чем мтДНК. Генетическая дифференциация выборки *A. japonicus*, полученная с помощью микросателлитных локусов, может быть объяснена типично высокой частотой мутаций этих маркеров. Однако без использования фрагмента гена *COI* мтДНК не удалось бы выявить подразделенность гаплотипов в исследуемом ареале *A. japonicus*.

Тесты программы BOTTLENECK 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 увеличение 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 между выборками *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: инбридингом и вероятным разбросом в репродуктивном успехе.

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 микросателлитных локусов яДНК *A. japonicus* в исследуемой акватории могут быть связаны с антропогенными факторами – браконьерским ловом и загрязнением прибрежной зоны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюлина М.Г. Запасы трепанга в заливе Петра Великого // Вопросы гидробиологии некоторых районов Тихого океана. 1972. С. 22-32.
2. Виноградов Л.Г. Определитель креветок, раков и крабов Дальнего Востока // Известия ТИНРО. 1950. Т. 33. С. 179-358.
3. Гаврилова Г.С. Температурный диапазон в жизнедеятельности трепанга в заливе Петра Великого (Японское море) // Океанология. 1995. Т. 35, № 3. С. 423–425.
4. Гаврилова Г.С., Кучерявенко А.В. Товарное выращивание дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в заливе Петра Великого: методические особенности, результаты работы хозяйства марикультуры в бухте Суходол // Известия ТИНРО. 2010. Т. 162. С. 342–354.
5. Гаврилова Г.С. Товарное выращивание дальневосточного трепанга. Владивосток: ТИНРО-центр, 2013. 99 с.
6. Гаврилова Г.С., Кондратьева Е.С. Результаты хозяйственной деятельности и проблемы развития марикультуры залива Посьета (Японское море) в 2000–2015 гг. // Известия ТИНРО. 2018. Т. 195. С. 229-243.
7. Галинская Т.В., Щепетов Д.М., Лысенков С.Н. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55, №6. С. 617-632.
8. Животовский Л.А. Генетика природных популяций. Йошкар-Ола: Типография «Вертикаль», 2021. 599 с.
9. Зуенко Ю.И., Рачков В.И. Климатические изменения температуры, солёности и концентраций биогенных элементов в Амурском заливе Японского моря // Известия ТИНРО. 2015. Т. 183, №4. С. 186-199.
10. Левин В.С. Дальневосточный трепанг. Владивосток: Дальневосточное книжное издательство, 1982. 191 с.

11. Левин В.С., Калинин В.И., Федоров С.Н., Смайли С. Структура тритерпеновых гликозидов и систематическое положение двух видов голотурий семейства Stichopodidae // Биология моря. 1986. №4. С. 72-77.
12. Левин С.В. Дальневосточный трепанг: биология, промысел, воспроизводство. СПб.: Голанд, 2000. 200 с.
13. Лучин В.А., Тихомирова Е.А., Круц А.А. Океанографический режим вод залива Петра Великого // Известия ТИНРО. 2005. Т.140. С.118-129.
14. Лысенко В.Н., Жариков В.В., Лебедев А.М., Долганов С.М. Современное состояние популяции дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в Дальневосточном морском заповеднике // Биология моря. 2018. Т. 44, №2. С. 133-139.
15. Лысенко В.Н., Жариков В.В., Лебедев А.М. Численность и распределение дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Stichopodidae) в прибрежной зоне южного участка Дальневосточного морского заповедника ДВО РАН // Биология моря. 2015. Т. 41, №2. С. 146-149.
16. Маляр В.В. Сравнительная филогеография четырех видов рыб семейств Salmonidae и Cyprinidae в Японском и Охотском морях: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владивосток, 2017. 157 с.
17. Мокрецова Н. Д. Биология размножения трепанга *Stichopus japonicus* Selenka как основа биотехники его разведения: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1978. 24 с.
18. Мокрецова Н.Д., Викторовская Г.И., Сухин И.Ю. Современное состояние культивирования дальневосточного трепанга в Приморье // Рыбное хозяйство. 2012. Т. 6. С. 58–63.
19. Подкорытов А.Г., Масленников С.И. Распределение дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) на открытой

акватории Амурского залива (Японское море) в условиях промысловой нагрузки // Вода: химия и экология. 2015. № 9. С. 49-57.

20. Селин Н.И. Вертикальное распределение дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в заливе Восток Японского моря // Биология моря. 2001. Т. 27, № 4. С. 297-299.

21. Терехова В.Е., Белькова Н.Л. Идентификация оппортунистических патогенов трепанга (*Apostichopus japonicus*), культивируемого в Приморском крае // Вода: химия и экология. 2016. № 1. С. 36–42.

22. Тетерина А.А. Генетическая история малой изолированной популяции атлантической трески *Gadus morhua* острова Кильдин: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2016. 114 с.

23. Туранов С.В., Картавец Ю.Ф., Земнухов В.В. Молекулярно-филогенетическое исследование некоторых представителей бельдюговидных рыб (Perciformes, Zoarcoidei) дальневосточных морей, основанное на нуклеотидной последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*Co-1*) // Генетика. 2012. Т. 48, №2. С.235–252.

24. 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.

25. 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.

26. Abdul-Muneer P.M. Application of microsatellite markers in conservation and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genetics Research International. 2014. Article no. 691759.

27. Adachi K., Okumura S., Moriyama S. Genetic structure of Japanese sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) along the Sanriku coast supports the effect of earthquakes and related tsunamis // *Genetica*. 2018. Vol. 146, №6. P. 497-503.
28. Adams R.I., Brown K.M., Hamilton M.B. The impact of microsatellite electromorph size homoplasy on multilocus population structure estimates in a tropical tree (*Corythophora alta*) and an anadromous fish (*Morone saxatilis*) // *Molecular Ecology*. 2004. Vol. 13. P. 2579–2588.
29. Addison J.A., Hart M.W. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites // *Marine Biology*. 2004. Vol. 144. P. 243-251.
30. Akaike H. A new look at the statistical model identification // *IEEE Transactions on Automatic Control*. 1974. Vol. AC-19. P. 716-723.
31. Allendorf F.W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity // *Zoo Biology*. 1986. Vol. 5. P. 181–190.
32. Allendorf F.W., Phelps S.R. Isozymes and the preservation of the genetic variation in salmonid fish // *Ecological Bulletin*. 1981. Vol. 34. P. 37–52.
33. An H.S., Lee J. W., Hong S.W., Hong H.N. Genetic differences between wild and hatchery populations of red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) inferred from microsatellite markers: implications for production and stocking programs design // *Genes and Genomics*. 2013. Vol. 35, №6. P. 709-717.
34. Arif I.A., Khan H.A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review // *Animal Biodiversity and Conservation*. 2009. Vol. 32, №1. P. 9-17.
35. Arndt A., Smith M.J. Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development // *Molecular Ecology*. 1998. Vol. 7. P. 1053–1064.
36. Arthofer W., Heussler K., Krapf P., Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M. Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: a case study in fly culturing // *Fly*. 2018. Vol. 12, №1. P. 13-22.

37. Astle W., Balding D.J. Population structure and cryptic relatedness in genetic association studies // *Statistical Science*. 2009. Vol. 24. P. 451–471.
38. Bagshaw A.T.M. Functional mechanisms of microsatellite DNA in eukaryotic genomes // *Genome Biology and Evolution*. 2017. Vol. 9, №9. P. 2428-2443.
39. Balitzki-Korte B., Anslinger K., Bartsch C., Rolf B. Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene // *International Journal of Legal Medicine*. 2005. Vol. 119. P. 291–294.
40. Ballard J.W.O., Whitlock M.C. The incomplete natural history of mitochondria // *Molecular Ecology*. 2004. Vol. 13. P. 729-744.
41. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Molecular Biology and Evolution*. 1999. Vol. 16, №1. P. 37-48.
42. Barfield S., Davies D., Matz M. Evidence of sweepstakes reproductive success in a broadcast-spawning coral and its implications for coral metapopulation persistence // *Molecular Ecology*. 2022. Vol. 32, №3. P. 696-702.
43. Baric S., Höllrigl A., Füreder L., Dalla Via J. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria) // *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*. 2005. Vol. 376-377. P. 599-612.
44. Barton N. H. Genetic hitchhiking // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2000. Vol. 355. P. 1553-1562.
45. Barry P., Broquet T., Gagnaire P.-A. Age-specific survivorship and fecundity shape genetic diversity in marine fishes // *Evolution Letters*. 2022. Vol. 6, №1. P. 46–62.
46. Batchelor S. Disease prevalence and the population genetic structure of *Crassostrea virginica* along the Georgia coast [Электронный ресурс]. 2021. Режим доступа: <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/etd/2347>

47. Batishcheva N.M., Brykov V.A. The search of polymorphic microsatellite loci for *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880 (Sebastidae) // Russian Journal of Marine Biology. 2021. Vol. 47, №4. P. 322–324.
48. Bensasson D., Zhang D.X., Hartl D.L., Hewitt G.M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses // Trends in Ecology & Evolution. 2001. Vol. 16. P. 314–321.
49. Bertoni F., Codegoni A.M., Furlan D., Tibiletti M.G., Capella C., Broggin M. *CHK1* frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancer // Genes Chromosomes Cancer. 1999. Vol. 26. P. 176-180.
50. Bertorelle G., Slatkin M. The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters // Molecular Biology and Evolution. 1995. Vol. 12. P. 887–892.
51. Bierne, N. The distinctive footprints of local hitchhiking in a varied environment and global hitchhiking in a subdivided population // Evolution. 2010. Vol. 64, №11. P. 3254-3272.
52. Biet E., Sun J., Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure // Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27. P. 596-600.
53. Bird K.A., An H., Gazave E., Gore M.A., Pires J.C., Robertson L.D. et al. Population structure and phylogenetic relationships in a diverse panel of *Brassica rapa* L. // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 8. Article no. 321.
54. Blaxter M. Molecular systematics – counting angels with DNA // Nature. 2003. Vol. 421. P. 122-124.
55. Boore J.L. Animal mitochondrial genomes // Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27. P. 1767–1780.
56. Bordbar S., Anwar F., Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review // Marine Drugs. 2011. Vol. 9. P. 1761–1805.
57. Borrero-Pérez G.H., González-Wangüemert M., Marcos C., Pérez-Ruzafa A. Phylogeography of the Atlanto-Mediterranean sea cucumber *Holothuria*

(*Holothuria*) *mammata*: the combined effects of historical processes and current oceanographical pattern // *Molecular Ecology*. 2011. Vol. 20, №9. P. 1964-1975.

58. Boyko A.V., Girich A.S., Eliseikina M.G., Maslennikov S.I., Dolmatov I.Yu. Reference assembly and gene expression analysis of *Apostichopus japonicus* larval development // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, №1. Article no. 1131.

59. Brito P.H. Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite genetic structure among western European populations of tawny owls (*Strix aluco*) // *Molecular Ecology*. 2007. Vol. 16. P. 3423-37.

60. Brookfield J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // *Molecular Ecology*. 1996. Vol. 5. P. 453-455.

61. Brown W.M. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1980. Vol. 77. P. 3605-3609.

62. Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication // *Nature Reviews Genetics*. 2003. Vol. 4, №11. P. 900-910.

63. Brunner P.C., Douglas M.R., Bernatchez L. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in arctic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes // *Molecular Ecology*. 1998. Vol. 7, №2. P. 209-223.

64. Burger G., Gray M.W., Lang B.F. Mitochondrial genomes: anything goes // *Trend in Genetics*. 2003. Vol. 19. P. 709–716.

65. Burton R.S., Feldman M. Population genetics of coastal and estuarine invertebrates: does larval behaviour influence population structure? // *Estuarine comparisons* / ed. Kennedy V.S. Academic Press, 1982. P. 537–551.

66. Caballero A., Garcia-Dorado A. Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation // *Genetics*. 2013. Vol. 195. P. 1373–1384.

67. Campagne P., Smouse P.E., Varouchas G., Silvain J.-F., Leru B. Comparing the van Oosterhout and Chybicki-Burczyk methods of estimating null

allele frequencies for inbred populations // *Molecular Ecology Resources*. 2012. Vol. 12, №6. P. 975-982.

68. Carlsson J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing // *Journal of Heredity*. 2008. Vol. 99, №6. P. 616-623.

69. Cavalli-Sforza L.L., Edwards, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // *Evolution*. 1967. Vol. 21, №3. P. 550–570.

70. Chakraborty R., Nei M. Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model // *Evolution*. 1977. Vol. 31, №2. P. 347-356.

71. Chakraborty R., de Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // *Annals of Human Genetics*. 1992. Vol. 56. P. 45-57.

72. Chakraborty R., Jin L. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances // *DNA Fingerprinting: State of the Science* / eds: Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T., Jeffreys A.J. *Progress in Systems and Control Theory*, 1992. P. 153–175.

73. Chambers G.K., MacAvoy E.S. Microsatellites: consensus and controversy // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2000. Vol. 126. P. 455–476.

74. Chang Y., Feng Z., Yu J., Ding J. Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers // *Marine Ecology*. 2009. Vol. 30. P. 455-461.

75. Chapius M.-P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24. P. 621-631.

76. Chauhan T., Rajiv K. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010. Vol. 1. P. 281-291.

77. Chen L., Yang J. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China // *Aquaculture Research*. 2008. Vol. 39. P. 1541-1549.

78. Chen M., Gao L., Zhang W., You H., Sun Q., Chang Y. Identification of forty-five gene-derived polymorphic microsatellite loci for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *Journal of Genetics*. 2013. Vol. 92, №2. P. 31-35.

79. Chistiakov D., Hellemans A.B., Volckaert F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics // *Aquaculture*. 2006. Vol. 255. P. 1-29.

80. Choi H., Jang J.E., Byeon S.Y., Kim Y.R., Maschette D., Chung S. et al. Genetic diversity and population structure of the antarctic toothfish, *Dissostichus mawsoni*, using mitochondrial and microsatellite DNA markers // *Frontiers in Marine Science*. 2021. Vol. 8. Article no. 6664.

81. Chust G., Villarino E., Chenuil A., Irigoien X., Bizsel N., Bode A. et al. Dispersal similarly shapes both population genetics and community patterns in the marine realm // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, №1. Article no. 28730.

82. Chybicki I., Burczyk J. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients // *Heredity*. 2009. Vol. 100, №1. P. 106-113.

83. Cockerham C.C. Analysis of gene frequencies // *Genetics*. 1973. Vol. 74, №3. P. 679-700.

84. Cornuet J.M., Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data // *Genetics*. 1996. Vol. 144. P. 2001-2014.

85. Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals // *Genetics*. 1999. Vol. 153, №4. P. 1989-2000.

86. Crawford M.K., Grimes C.B., Buroker N.E. Stock identification of weakfish, *Cynoscion regalis*, in the middle Atlantic region // *Fishery Bulletin*. 1989. Vol. 87. P. 205-211.

87. Creel S., Spong G., Sands J.L., Rotella J., Zeigle J., Joe L. et al. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes // *Molecular Ecology*. 2003. Vol. 12, №7. P. 2003–2009.

88. Curtu A.-L., Finkeldey R., Gailing O. Comparative sequencing of a microsatellite locus reveals size homoplasy within and between european oak species (*Quercus spp.*) // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2004. Vol. 22. P. 339-346.

89. Dąbrowski M.J., Bornelov S., Kruczyk M. Baltzer N., Komorowski J. "True" null allele detection in microsatellite loci: a comparison of methods, assessment of difficulties and survey of possible improvements // *Molecular Ecology Resources*. 2015. Vol. 15, №3. P. 477-488.

90. Dakin E.E., Avise J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis // *Heredity*. 2004. Vol. 93, №5. P. 504-509.

91. Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm // *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 1977. Vol. 39, №1. P. 1-38.

92. Dong Y., Li Q., Zhong X., Kong L. Development of gene-derived SNP markers and their application for the assessment of genetic diversity in wild and cultured populations in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *Journal of the World Aquaculture Society*. 2016. Vol. 47, №6. P. 873-888.

93. Drose S., Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 748. P. 145-169.

94. Du H., Bao Z., Yan J., Tian M., Mu X., Wang S. et al. Development of 101 gene-based single nucleotide polymorphism markers in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13. P. 7080-7097.

95. Dubrovskii S.V., Sergeenko V.A. Distribution pattern of far eastern sea cucumber *Apostichopus japonicus* in Busse Lagoon (Southern Sakhalin) // *Russian Journal of Marine Biology*. 2002. Vol. 28, №2. P. 87–93.

96. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization // *Current Bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16-27.
97. Eble J.A., Toonen R.J., Sorensen L.L., Basch L.V., Papastamatiou Y.P., Bowen B.W. Escaping paradise: larval export from Hawaii in an Indo-Pacific reef fish, the yellow tang (*Zebrasoma flavescens*) // *Marine Ecology Progress Series*. 2011. Vol. 428. P. 245–258.
98. Edelist C., Lexer C., Dillmann C., Sicard D., Rieseberg L.H. Microsatellite signature of ecological selection for salt tolerance in a wild sunflower hybrid species, *Helianthus paradoxus* // *Molecular Ecology*. 2006. Vol. 15, №14. P. 4623-4634.
99. Edgar R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity // *BMC Bioinformatics*. 2004. Vol. 5. Article no. 113.
100. Ekman S. Zoogeography of the sea. Sidgwick & Jackson, London, 1953. 417 p.
101. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nature Reviews Genetics*. 2004. Vol. 5. P. 435-445.
102. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE, a simulation study // *Molecular Ecology*. 2005. Vol. 14. P. 2611-2620.
103. Excoffier L., Smouse P., Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics*. 1992. Vol. 131. P. 479-491.
104. Excoffier L., Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Molecular Ecology Resources*. 2010. Vol. 10. P. 564-567.
105. Fairweather P.G. Implications of ‘supply-side’ ecology for environmental assessment and management // *Trends in Ecology & Evolution*. 1991. Vol. 6. P. 60–63.

106. Faure M.F., David P., Bonhomme F., Bierne N. Genetic hitchhiking in a subdivided population of *Mytilus edulis* // BMC Evolutionary Biology. 2008. Vol. 8. Article no. 164.
107. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783–791.
108. Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // Cladistics. 1989. Vol. 5. P. 164-166.
109. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6 [Электронный ресурс]. 2005. Режим доступа: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
110. Filatov D.A. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, №23. P. 3189-3190.
111. di Finizio A., Guerriero G., Russo G.L., Ciarcia G. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR–RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments // European Food Research and Technology. 2007. Vol. 225. P. 337–344.
112. Flowers J.M., Schroeter S.C., Burton R.S. The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Evolution. 2002. Vol. 56, №7. P. 1445-1453.
113. Foll M., Gaggiotti O.E. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective // Genetics. 2008. Vol. 180. P. 977-993.
114. Frankham R., Ballou J., Briscoe D., McInnes K. Population fragmentation // Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, 2002. P. 309-335.
115. Fratini S., Ragionieri L., Deli T., Harrer A., Marino I.A.M., Cannicci S. et al. Unravelling population genetic structure with mitochondrial DNA in a notional panmictic coastal crab species: sample size makes the difference // BMC Evolutionary Biology. 2016. Vol. 16. Article no. 150.

116. Fratini S., Ragionieri L., Cutuli G., Vannini M., Cannicci S. Pattern of genetic isolation in the crab *Pachygrapsus marmoratus* within the Tuscan archipelago (Mediterranean Sea) // Marine Ecology Progress Series. 2013. Vol. 478. P. 173–183.
117. Freeland J.R., Petersen S.D., Kirk H. Molecular Ecology. Wiley-Blackwell, 2011. 464 p.
118. Fu Y.X. Statistical test of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. Vol. 147, №2. P. 915–925.
119. Funk W.C., McKay J.K., Hohenlohe P.A., Allendorf F.W. Harnessing genomics for delineating conservation units // Trends in Ecology and Evolution. 2012. Vol. 27. P. 489–496.
120. Furlan E., Stoklosa J., Griffiths J., Gust N., Ellis R., Huggins R.M. et al. Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus* // Ecology and Evolution. 2012. Vol. 2, №4. P. 844–857.
121. Galarza J.A., Carreras-Carbonell J., Macpherson E., Pascual M., Roques S., Turner G.F. et al. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106. P. 1473–1478.
122. Gallagher S.J., Kitamura A., Iryu Y., Itaki T., Koizumi I., Hoiles P.W. The Pliocene to recent history of the Kuroshio and Tsushima Currents: a multi-proxy approach // Progress in Earth and Planetary Science. 2015. Vol. 2. Article no. 17.
123. Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal // Molecular Ecology. 2009. Vol. 18. P. 4541–4550.
124. Gao L., He C., Bao X., Tian M., Ma Z. Transcriptome analysis of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with variation in individual growth // PLoS ONE. 2017. Vol. 12, №7. Article no. e0181471.

125. Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10. P. 305–318.
126. Gaur U., Chaudhury A., Singh D.K., Kumar S., Tandia M.S., Viji R.K. Genetic bottleneck studies in five duck (*Anas platyrhynchos*) populations of India // *Indian Journal of Animal Sciences*. 2010. Vol. 80, №11. P. 1103–1108.
127. Giantsis I.A., Mucci N., Randi E., Abatzopoulos T.J., Apostolidis A.P. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Central and Eastern Mediterranean: genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Sea // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2014. Vol. 94. P. 797–809.
128. Girard P., Angers B. Assessment of power and accuracy of methods for detection and frequency-estimation of null alleles // *Genetica*. 2008. Vol. 134, №2. P. 187-197.
129. Girard P. A robust statistical method to detect null alleles in microsatellite and SNP datasets in both panmictic and inbred populations // *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. 2011. Vol. 10. Article no. 9.
130. Gissi C., Iannelli F., Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species // *Heredity*. 2008. Vol. 101, №4. P. 301–320.
131. Glenn T.C., Schable N.A. Isolating microsatellite DNA loci // *Methods in Enzymology*. 2005. Vol. 395. P. 202-222.
132. Gomes M.L., Hatanaka T., de Campos W.N., Wasko A.P. Assessing paternity in Japanese quails (*Coturnix japonica*) using microsatellite markers-inferences for its mating system and reproductive success // *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2013. Vol. 15, №4. P. 329–338.
133. Gilbert K.J., Andrew R.L., Bock D.G., Franklin M.T., Kane N.C., Moore J.S. et al. Recommendations for utilizing and reporting population genetic analyses: the reproducibility of genetic clustering using the program STRUCTURE // *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21. P. 4925–4930.

134. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics // *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86, №6. P. 485–486.
135. Graves J.E. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes // *Journal of Heredity*. 1998. Vol. 89. P. 427–437.
136. Greenbaum G., Templeton A.R., Zarmi Y., Bar-David S. Allelic richness following population founding events – a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, №12. Article no. e115203.
137. Grimaldi M.-C., Crouau-Roy B. Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences // *Journal of Molecular Evolution*. 1997. Vol. 44. P. 336–340.
138. Habza-Kowalska E., Grela M., Gryzińska M., Listos P. Molecular techniques for detecting food adulteration // *Medycyna Weterynaryjna*. 2019. Vol. 75. P. 404–409.
139. Hale M.L., Burg T.M., Steeves T.E. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, №9. Article no. e45170.
140. Hamamoto K., Soliman T., Polisenno A., Iria Fernandez-Silva I., Reimer J.D. Higher genetic diversity of the common sea cucumber *Holothuria (Halodeima) atra* in marine protected areas of the Central and Southern Ryukyu Islands // *Frontiers in Conservation Science*. 2021. Vol. 2. Article no. 736633.
141. Hamel J.-F., Mercier A. 2013. *Apostichopus japonicus*. The IUCN Red List of threatened species [Электронный ресурс]. 2013. Режим доступа: <https://www.iucnredlist.org/species/180424/1629389>
142. Harpending R.C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution // *Human Biology*. 1994. Vol. 66. P. 591–600.

143. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.A. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // Proceedings of Royal Society London. 2002. Vol. 270. P. S96-S99.

144. Hedgecock D. Genetic consequences of larval retention: theoretical and methodological aspects // Estuarine comparisons / ed. Kennedy V.S. Academic Press, 1982. P. 553–568.

145. Hedgecock D. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? // Bulletin of Marine Science. 1986. Vol. 39, № 2. P. 550–564.

146. Hedgecock D., Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Aquaculture. 1990. Vol. 88. P. 21–38.

147. Hedgecock D. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? // Genetic and Evolution of Aquatic Organisms / ed. Beaumont A. Chapman and Hall, 1994. P. 122–134.

148. Hedgecock D., Launey S., Pudovkin A.I., Naciri Y., Lapègue S., Bonhomme F. Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis* // Marine Biology. 2007. Vol. 150. P. 1173–1182.

149. Hedgecock D., Pudovkin A.I. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary // Bulletin of Marine Science. 2011. Vol. 87, №4. P. 971-1002.

150. Hedrick P.W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation // Evolution. 1999. Vol. 53. P. 313-318.

151. Hellberg M.E., Burton R.S., Neigel J.E., Palumbi S.R. Genetic assessment of connectivity among marine populations // Bulletin of Marine Science. 2002. Vol. 70, №1. P. 273–290.

152. Hoareau T.B., Boissin E. Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: addressing the need for efficient *COI* amplification in the Echinodermata // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10. P. 960–967.

153. Hoffman E.K., Trusko S.P., Murphy M., George D.L. An *SI* nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the *c-Ki-ras* promoter interacts with a nuclear factor // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1990. Vol. 56. P. 2705-2709.

154. von Holdt B.M., Stahler D.R., Bangs E.E., Smith D.W., Jimenez M.D., Mack C.M. et al. A novel assessment of population structure and gene flow in grey wolf populations of the Northern Rocky Mountains of the United States // Molecular Ecology. 2010. Vol. 19. P. 4412–4427.

155. Hu C., Xu Y., Wen J., Zhang L., Fan S., Su T. Larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus* sp. (Curry fish) // Aquaculture. 2010. Vol. 300, №1–4. P. 73–79.

156. Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information // Molecular Ecology Resources. 2009. Vol. 9. P. 1322-1332.

157. Hudson R.R., Slatkin M., Maddison W.P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data // Genetics. 1992. Vol. 132, №2. P. 583–589.

158. Hui M., Nuryanto A., Kochzius M. Concordance of microsatellite and mitochondrial DNA markers in detecting genetic population structure in the boring giant clam *Tridacna crocea* across the Indo-Malay Archipelago // Marine Ecology. 2016. Vol. 38, №1. Article no. e12389.

159. Hunter R.L., Market C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels // Science. 1957. Vol. 125. P. 1294–1295.

160. Hurst G.D.D, Jiggins F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts // Proceedings of the Royal Society B. 2005. Vol. 272. P.1525-1534.

161. Inaba N., Matsumoto T., Kawai H., Anaguchi Y., Matsuno K. Predation of juvenile Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* by kelp crab *Pugettia ferox* // Frontiers in Marine Science. 2021. Vol. 8. Article no. 684989.

162. Janes J.K., Miller J.M., Dupuis J.R., Malenfant R.M., Gorrell J.C., Cullingham C.I. et al. The $K = 2$ conundrum // *Molecular Ecology*. 2017. Vol. 26, №14. P. 3594-3602.

163. Jarne P., Lagoda P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back // *Trends in Ecology & Evolution*. 1996. Vol. 10. P. 424-429.

164. Jentzsch I.M.V., A. Bagshaw, Buschiazzi E., Merkel A., Gemmel N.J. Evolution of microsatellite DNA [Электронный ресурс]. 2008. Режим доступа: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0020847.pub2>

165. Jo J., Oh J., Lee H.-G., Hong H.-H., Lee S.-G., Cheon S. et al. Draft genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* and genetic polymorphism among color variants // *GigaScience*. 2017. Vol. 6. P. 1-6.

166. Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene // *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15. P. 1481–1490.

167. Johnson M.S., Black R. Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. // *Marine Biology*. 1982. Vol. 70. P. 157–164.

168. Jones A.G., Stockwell C.A., Walker D., Avise J.C. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish // *The Journal of Heredity*. 1998. Vol. 89, №4. P. 339-342.

169. Jones A.G. GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents // *Molecular Ecology Notes*. 2005. Vol. 5, №3. P. 708–711.

170. Jones O.R., Wang J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data // *Molecular Ecology Resources*. 2010. Vol. 10, №3. P. 551–555.

171. de Jong M.A., Wahlberg N., van Eijk M., Brakefield P.M., Zwaan B.J. Mitochondrial DNA signature for range-wide populations of *Bicyclus anynana* suggests a rapid expansion from recent refugia // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, №6. Article no. e21385.

172. Kalinowski S.T. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? // *Heredity*. 2002. Vol. 88. P. 62-65.

173. Kalinowski S.T., Taper M.L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci // *Conservation Genetics*. 2006. Vol. 7. P. 991-995.

174. Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment // *Molecular Ecology*. 2007. Vol. 16. P. 1099-1106.

175. Kane N.C., Rieseberg L.H. Selective sweeps reveal candidate genes for adaptation to drought and salt tolerance in common sunflower, *Helianthus annuus* // *Genetics*. 2007. Vol. 175. P. 1823-1834.

176. Kang J.-H., Kim Y.-K., Kim M.-J., Park J.-Y., An C.-M., Kim B.-S. et al. Genetic differentiation among populations and color variants of sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from Korea and China // *International Journal of Biological Sciences*. 2011. Vol. 7, №3. P. 323–332.

177. Kanno M., Li Q., Kijima A. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*) // *Marine Biotechnology*. 2005. Vol. 7. P. 179-183.

178. Kanno M., Li Q., Kijima A. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants // *Marine Biotechnology*. 2006. Vol. 8. P. 672-685.

179. Karl S.A., Toonen R.J., Grant W.S., Bowen B.W. Common misconceptions in molecular ecology: echoes of the modern synthesis // *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21. P. 4171–4189.

180. Kartavtsev Yu.Ph., Sharina S.N., Goto T., Balanov A.A., Hanzawa N. Sequence diversity at cytochrome oxidase 1 (*Co-1*) gene among sculpins (Scorpaeniformes, Cottidae) and some other scorpionfish of Russia Far East with phylogenetic and taxonomic insights // *Genes and Genomics*. 2009. Vol. 31, №2. P. 191–205.

181. Kelly R.P., Palumbi S.R. Genetic structure among 50 species of the Northeastern Pacific rocky intertidal community // PLoS ONE. 2010. Vol. 5, №1. Article no. e8594.
182. Kennington W.J., Berry O., Groth D.M., Johnson M.S., Melville-Smith R. Spatial scales of genetic patchiness in the western rock lobster *Panulirus cygnus* // Marine Ecology Progress Series. 2013. Vol. 486. P. 213–221.
183. Kim M., Choi T., An H.S. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers // Aquaculture Research. 2008. Vol. 39. P. 1038-1045.
184. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16, №2. P. 111–120.
185. Kolodner R.D., Marsischky G.T. Eukaryotic DNA mismatch repair // Current Opinion Genetics. 1999. Vol. 9. P. 89-96.
186. Kolodziej K., Theissingner K., Brün J., Schulz H.K., Schulz R. Determination of the minimum number of microsatellite markers for individual genotyping in wild boar (*Sus scrofa*) using a test with close relatives // European Journal of Wildlife Research. 2012. Vol. 58. P. 621-628.
187. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Molecular Ecology Resources. 2015. Vol. 15, №5. P. 1179-1191.
188. Kordos L.M., Burton R.S. Genetic differentiation of Texas Gulf coast populations of the blue crab *Callinectes sapidus* // Marine Biology. 1993. Vol. 117. P. 227–233.
189. Koskinen M.T., Hirvonen H., Landry P.-A., Primmer C.R. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective // Hereditas. 2004. Vol. 141. P. 61-67.
190. Kowalczyk M., Staniszewski A., Kamińska K., Domaradzki P., Horecka B. Advantages, possibilities, and limitations of mitochondrial DNA

analysis in molecular identification // *Folia Biologica*. 2021. Vol. 69, №3. P. 101-111.

191. Kumar V., Chandra K., Kundu S., Tyagi K., Laskar B.A., Singha D. et al. Utility of mitochondrial DNA in wildlife forensic science: reliable identification of confiscated materials from Eastern India // *Mitochondrial DNA Part B*. 2019. Vol. 4. P. 583-588.

192. Lacy R.C. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision // *Conservation Biology*. 1987. Vol. 1. P. 143–158.

193. Langella O. Populations [Электронный ресурс]. 1999. Режим доступа: <https://bioinformatics.org/populations>

194. Larsson L.C., Charlier J., Laikre L., Ryman N. Statistical power for detecting divergence – organelle versus nuclear markers // *Conservation Genetics*. 2009. Vol. 10. P. 1255–1264.

195. Leberg P.L. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis // *Evolution*. 1992. Vol. 46. P. 477–494.

196. Lemer S., Rochel E., Planes S. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* // *Journal of Heredity*. 2011. Vol. 102, №2. P. 243-246.

197. Levin L.A. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions // *Integrative and Comparative Biology*. 2006. Vol. 46. P. 282–297.

198. Levin V.S. About the Latin name of the Japanese sea cucumber // *SPC Beche-de mer Information Bulletin*. 1999. Vol. 11. P. 25.

199. Levinson G., Gutman G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution // *Molecular and Biology Evolution*. 1987. Vol. 4. P. 203-221.

200. Lewontin R.C., Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms // *Genetics*. 1973. Vol. 74. P. 175–195.

201. Li M.-H., Iso-Touru T., Laurén H., Kantanen J. A microsatellite-based analysis for the detection of selection on BTA1 and BTA20 in northern Eurasian cattle (*Bos taurus*) populations // *Genetics Selection Evolution*. 2010. Vol. 42. Article no. 32.

202. Li M.-M., Li B.-L., Jiang S.-X., Zhao Y.-W., Xu X.-L., Wu J.-X. Microsatellite-based analysis of genetic structure and gene flow of *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in China // *Ecology and Evolution*. 2019. Vol. 23. P. 13426–13437.

203. Li Q., Chen L., Kong L. A genetic linkage map of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), based on AFLP and microsatellite markers // *Animal Genetics*. 2009. Vol. 40, №5. P. 678-685.

204. Li Q., Park C., Kobayashi T., Kijima A. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* // *Marine Biotechnology*. 2003. Vol. 5, №4. P. 331-338.

205. Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms // *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11. P. 2453-2465.

206. Li Y.-L., Liu J.-X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods // *Molecular Ecology Resources*. 2018. Vol. 18, №1. P. 176-177.

207. Liao Y. The Aspidochirote holothurians of China with erection of a new genus. Echinoderms: Present and past // *Proceedings of the European Colloquium on Echinoderms* / ed. M. Jangoux. Brussels, 1980. P. 115-120.

208. Lischer H.E.L., Excoffier L. PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs// *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 298-299.

209. Liu Q., Goudie C.A., Simco B.A., Davis K.B., Morizot D.C. Gene-centromere mapping of six enzyme loci in gynogenetic channel catfish // *Journal of Heredity*. 1992. Vol. 83. P. 245–248.
210. Liu Q., Goudie C.A., Simco B.A., Davis K.B. Sex-linkage of glucosephosphate isomerase-B and mapping of the sex-determining gene in channel catfish // *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1996. Vol. 73. P. 282–285.
211. Liu Z.J., Cordes J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics // *Aquaculture*. 2004. Vol. 238. P. 1-37.
212. Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.-M., Sherwin W.B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks // *Journal of Heredity*. 1998. Vol. 89, №3. P. 238-247.
213. Luttikhuisen P.C., Campos J., van Bleijswijk J., Peijnenburg K.T.C.A., van der Veer H.W. Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. Vol. 46, № 3. P. 1015-1030.
214. Manly B.F.J. Tests of the theory of natural selection: an overview // *Journal of the Royal Society of New Zealand*. 1985. Vol. 15, №4. P. 411-432.
215. Marjoram P., Donnelly P. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution // *Genetics*. 1994. Vol. 136. P. 673–683.
216. Maruyama T., Fuerst P.A. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck // *Genetics*. 1985. Vol. 111. P. 675-689.
217. McCartney M.A., Brayer K., Levitan D.R. Polymorphic microsatellite loci from the red urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, with comments on heterozygote deficit // *Molecular Ecology Notes*. 2004. Vol. 4. P. 226-228.
218. Meeûs D.T. Revisiting FIS, FST, Wahlund effects, and null alleles // *Journal of Heredity*. 2018. Vol. 19, №4. P. 446-456.

219. Miller A.K., Kerr A.M., Paulay G., Reich M., Wilson N.G., Carvajal J.I. et al. Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2017. Vol. 111. P. 110-131.

220. Mitsuhiro N., Yasuyuki I., Syuiti A. Novel primer sets for species-specific amplification of the mitochondrial 12S rRNA genes in four Japanese woodpeckers (Picidae, Piciformes) // *Meat Science*. 2004. Vol. 66. P. 551–556.

221. Moberg P.E., Burton R.S. Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Stongylocentrotus franciscanus* // *Marine Biology*. 2000. Vol. 136. P. 773–784.

222. Moore W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial gene trees versus nuclear-gene trees // *Evolution*. 1995. Vol. 49. P. 718–726.

223. Morgan S.G. Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation // *Ecology of marine invertebrate larvae* / ed. McEdward L. CRC Press, 1995. P. 279–321.

224. Morizot D., Schmidt M., Carmichael G. Joint segregation of allozymes in catfish genetic crosses: designation of *Ictalurus punctatus* linkage group I // *Transactions of the American Fisheries Society*. 1994. Vol. 123. P. 22–27.

225. Morris-Pocock J.A., Taylor S.A., Birt T.P., Friesen V.L. Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in three related seabird species // *BMC Evolutionary Biology*. 2010. Vol. 10. Article no. 14.

226. Mu W., Liu J., Zhang H. Complete mitochondrial genome of *Benthodytes marianensis* (Holothuroidea: Elasipodida: Psychropotidae): insight into deep sea adaptation in the sea cucumber // *PLoS ONE*. 2108. Vol. 13, №11. Article no. e0208051.

227. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986. Vol. 51. P.263-273.

228. Nehemia A., Kochzius M. Reduced genetic diversity and alteration of gene flow in a fiddler crab due to mangrove degradation // PLoS ONE. 2017. Vol.12. Article no. 8.
229. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist. 1972. Vol. 106. P. 283–292.
230. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations // Annals of Human Genetics. 1977. Vol. 41, №2. P. 225-33.
231. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: Oxford University Press, 2000. 333 p.
232. Neophytou C. Bayesian clustering analyses for genetic assignment and study of hybridization in oaks: effects of asymmetric phylogenies and asymmetric sampling schemes // Tree Genetics & Genomes. 2014. Vol. 10. P. 273-285.
233. O'Connor M.I., Bruno J.F., Gaines S.D., Halpern B.S., Lester S.E., Kinlan B.P. et al. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. Vol. 104. P. 1266–1271.
234. Ogoh K., Ohmiya Y. Concerted evolution of duplicated control regions within an ostracod mitochondrial genome // Molecular Biology and Evolution. 2007. Vol. 24. P. 74–78.
235. Oh G.-W., Ko S.-C., Lee D.H., Heo S.-J., Jung W.-K. Biological activities and biomedical potential of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): a review // Fisheries and Aquatic Science. 2017. Vol. 20. Article no. 28.
236. Ohtsuchi N., Kawamura T. Redescriptions of *Pugettia quadridens* (De Haan, 1837) and *P. intermedia* Sakai, 1938 (Crustacea: Brachyura: Epialtidae) with description of a new species // Zootaxa. 2019. Vol. 4672, №1. P. 001–068.
237. Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites // Genetics and Molecular Biology. 2006. Vol. 29, №2. P. 294-307.

238. Onuma M., Suzuki M., Ohtaishi N. Possible conservation units of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak based on variation of mtDNA control region // Japanese Journal of Veterinary Research. 2006. Vol. 54. P. 135–139.

239. van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecology notes. 2004. Vol. 4. P. 535-538.

240. Paetkau D., Clarkson L.P., Craighead L., Strobeck C. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations // Genetics. 1997. Vol. 147, №4. P. 1943-1957.

241. Page R. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // Bioinformatics. 1996. Vol. 12, №4. P. 357-358.

242. Palumbi S.R., Wilson A.C. Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis* // Evolution. 1990. Vol. 44. P. 403–415.

243. Palumbi S.R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 1994. Vol. 25. P. 547–572.

244. Palumbi S.R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction // Molecular Systematics / eds.: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Sinauer & Associates Inc., 1996. P. 205-247.

245. Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C., Fuerst P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker // Ecology. 1998. Vol. 79. P. 361–382.

246. Pascoal A., Barros-Velázquez J., Cepeda A., Gallardo J.M., Calomata P. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method based on the analysis of a 16S rRNA/tRNA(Val) mitochondrial region for species identification of commercial penaeid shrimps (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) of food interest // Electrophoresis. 2008. Vol. 29. P. 499–509.

247. Pathak R.U., Mamillapalli A., Rangaraj N., Kumar R.P., Vasanthi D., Mishra K. et al. AAGAG repeat RNA is an essential component of nuclear matrix in *Drosophila* // RNA Biology. 2013. Vol. 10. P. 564–571.

248. Patton J.C., Gallaway B.J., Fechhelm R.G., Cronin M.A. Genetic variation of microsatellite and mitochondrial DNA markers in broad whitefish (*Coregonus nasus*) in the Colville and Sagavanirktok rivers in northern Alaska Canadian // Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1997. Vol. 54. P. 1548–1556.

249. Paulay G. *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) [Электронный ресурс]. 2013. Режим доступа: www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=241776

250. Pavlidis P., Hutter S., Stephan W. 2008 A population genomic approach to map recent positive selection in model species // Molecular Ecology. 2008. Vol. 17. P. 3585–3598.

251. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Bioinformatics. 2012. Vol. 28, № 19. P. 2537-2539.

252. Pearson C.E., Sinden R.R. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci // Biochemistry. 1996. Vol. 35, №15. P. 5041-5053.

253. Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Stoelting R., Doucet-Béer E., Robinson S. et al. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines // Molecular Ecology. 2012. Vol. 21. P. 3403-3418.

254. Peng W., Bao Z.M., Du H.X., Yan J.J., Zhang L.L., Hu J.J. Development and characterization of 70 novel microsatellite markers for the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) // Genetics and Molecular Research. 2012. Vol. 11, №1. P. 434-439.

255. Péntzes Z., Csanádi G., Kovács G.M., Beer Z. Molecular markers in ecology // Tiscia. 2002. Vol. 33. P. 9-30.

256. Piry S., Luikart G., Cornuet J.-M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data // *Journal of Heredity*. 1999. Vol. 90. P. 502–503.

257. Powell W., Machray G.C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats // *Trends in Plant Science*. 1996. Vol. 1. P. 215-222.

258. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. Vol. 155, №2. P. 945-959.

259. Puechmaille S.J. The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: sub-sampling and new estimators alleviate the problem // *Molecular Ecology Resources*. 2016. Vol. 16. P. 608-627.

260. Purcell S.W., Samyn Y., Conand C. Commercially important sea cucumbers of the world // *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6* / eds. De Angelis N., Lovatelli A. Rome, 2012. P. 223.

261. Qiu T., Zhang T., Hamel J.-F., Mercier A. Development, settlement, and post-settlement growth // *The sea cucumber *Apostichopus japonicus*. History, biology and aquaculture* / eds: Yang H., Hamel J.-F., Mercier A. Academic, 2015. P. 111-131.

262. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System // *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7, №3. P. 355–364.

263. Ray N., Currat M., Excoffier L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations // *Molecular Biology and Evolution*. 2003. Vol. 20. P. 76-86.

264. Reiner G., Lang M., Willems H. Impact of different panels of microsatellite loci, different numbers of loci, sample sizes, and gender ratios on population genetic results in red deer // *European Journal of Wildlife Research*. 2019. Vol. 65. Article no. 25.

265. Rico C., Cuesta J.A., Drake P., Macpherson E. Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*) // PeerJ. 2017. Vol.5. Article no. e3188.

266. di Rienzo A., Donnelly P., Toomajian C., Sisk B., Hill A., Petzl-Erle M.L. Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci, and implications for human demographic histories // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 1269-1284.

267. Rodrigues F., Valente S., González-Wanguemert M. Genetic diversity across geographical scales in marine coastal ecosystems: *Holothuria arguinensis* a model species // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2015. Vol. 463. P. 158–167.

268. Rodriguez-Ramilo S.T., Wang J. The effect of close relatives on unsupervised Bayesian clustering algorithms in population genetic structure analysis // Molecular Ecology. 2012. Vol. 12. P. 873–884.

269. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Molecular Biology and Evolution. 1992. Vol. 9. P. 552-569.

270. Rogers A.R. Genetic evidence for a Pleistocene population expansion // Evolution. 1995. Vol. 49. P. 608-615.

271. Rousset F. Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux // Molecular Ecology Resources. 2008. Vol. 8. P. 103-106.

272. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets // Molecular Biology and Evolution. 2017. Vol. 34, №12. P. 3299–3302.

273. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985. Vol. 230. P. 1350–1354.

274. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4. P. 406-425.
275. Schlötterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion // *Nature Reviews Genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–70.
276. Schneider S., Excoffier L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA // *Genetics*. 1999. Vol. 152. P. 1079-1089.
277. Sekino M., Takagi N., Hara M., Takahashi H. Analysis of microsatellite DNA polymorphisms in rockfish *Sebastes thompsoni* and application to population genetics studies // *Marine Biotechnology*. 2001. Vol. 3, №1. P. 45–52.
278. Selenka, E. Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien // *Zoology*. 1867. Vol. 17. P. 291-374.
279. Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers // *Ecology Letters*. 2006. Vol. 9, №5. P. 615-629.
280. Selkoe K.A., Toonen R.J. Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal // *Marine Ecology Progress Series*. 2011. Vol. 436. P. 291–305.
281. Semagn K., Bjørnstad Å., Njiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants // *African Journal of Biotechnology*. 2006. Vol. 25, №5. P. 2540-2568.
282. Shangguan J., Li Z. Development of novel microsatellite markers for *Holothuria scabra* (Holothuriidae), *Apostichopus japonicus* (Stichopodidae) and cross-species testing in other sea cucumbers // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2018. Vol. 36. P. 519-527.
283. Silva C.N.S., Gardner J.P.A. Identifying environmental factors associated with the genetic structure of the New Zealand scallop: linking seascape

genetics and ecophysiological tolerance // ICES Journal of Marine Science. 2016. Vol. 73, №7. P. 1925-1934.

284. Silva I.C., Mesquita N., Schubart C.D., Alves M.J., Paula J. Genetic patchiness of the shore crab *Pachygrapsus marmoratus* along the Portuguese coast // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2009. Vol. 378. P. 50–57.

285. Simões T.D., Azevedo E., Silva F.H., Sousa J.N., Brito A.C., Pombo A. et al. Ecological traits of sea cucumbers with commercial relevance from the north-eastern Atlantic coast [Электронный ресурс]. 2019. Режим доступа: https://www.frontiersin.org/10.3389%2Fconf.FMARS.2018.06.00147/event_abstract

286. Skillings D.J., Bird C.E., Toonen R.J. Comparative population structure of two edible Indo-Pacific coral reef sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) // Bulletin of Marine Science. 2014. Vol. 90, №1. P. 359–378.

287. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies // Genetics. 1995. Vol. 139. P. 457–462.

288. Smith J.M., Haigh J. The hitch-hiking effect of a favourable gene // Genetical Research. 1974. Vol. 23, №1. P. 23-35.

289. So J., Uthicke S., Hamel J.-F., Mercier A. Genetic population structure in a commercial marine invertebrate with long-lived lecithotrophic larvae: *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) // Marine Biology. 2011. Vol. 158. P. 859-870.

290. Sokal R.R., Michener C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships // University of Kansas Science Bulletin. 1958. Vol. 38. P. 1409-1438.

291. Soliman T., Kanno M., Kijima A., Yamazaki Y. Population genetic structure and gene flow in the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* across Toyama Bay, Japan // Fisheries Science. 2012. Vol. 78, №4. P. 775-783.

292. Soliman T., Fernandez-Silva I., Reimer J.D. Genetic population structure and low genetic diversity in the over-exploited sea cucumber *Holothuria edulis* Lesson, 1830 (Echinodermata: Holothuroidea) in Okinawa Island // Conservation Genetics. 2016. Vol. 17. P. 811–821.

293. Somura H., Hori H., Manome Y. Sequence analysis of mitochondrial DNAs of 12S rRNA, 16S rRNA, and cytochrome oxidase subunit 1(*COI*) regions in slow lorises (genus *Nycticebus*) may contribute to improved identification of confiscated specimens // International Scholarly Research Notices. 2012. Vol. 2012. Article no. 498731.
294. Stobutzki I.C. Marine reserves and the complexity of larval dispersal // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2001. Vol. 10. P. 515–518.
295. Stoneking M., May B., Wright J.E. Loss of duplicate gene expression in salmonids: evidence for a null allele polymorphism at the duplicate aspartate aminotransferase locus in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) // Biochemical Genetics. 1981. Vol. 19. P. 1063–1077.
296. Strand M., Prolla T.A., Liskay L.M., Petes T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch // Nature. 1993. Vol. 365. P. 274-276.
297. Sugaya T., Ikedo M., Mori H., Taniguchi N. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus* // Fisheries Science. 2002. Vol. 68. P. 299-305.
298. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989a. Vol. 123. P. 585–595.
299. Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism // Genetics. 1989b. Vol. 123. P. 597–601.
300. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // Molecular Biology and Evolution. 2021. Vol. 38. P. 3022-3027.
301. Taris N., Boudry P., Bonhomme F., Camara M.D., Lapègue S. Mitochondrial and nuclear DNA analysis of genetic heterogeneity among recruitment cohorts of the European flat oyster *Ostrea edulis* // The Biological Bulletin. 2009. Vol. 217, №3. P. 233-241.

302. Tatarenkov A., Avise J.C. Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA // *Proceedings of the Royal Society B*. 2007. Vol. 274. P. 1795–1798.

303. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // *Nucleic Acid Research*. 1989. Vol. 17, № 16. P. 6463–6471.

304. Taylor M.S., Helberg M.E. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish // *Science*. 2003. Vol. 299. P. 107–109.

305. Tian M., Li Y., Jing J., Mu C., Du H., Dou J. et al. Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. Article no. 14852.

306. Toews D.P.L., Brelsford A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals // *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21, №16. P. 3907–3930.

307. Truett G.E. Preparation of Genomic DNA from Animal Tissues // *DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup* / ed. J. Kieleczawa. Jones and Bartlett Publishers, 2006. P. 33–46.

308. Tyler P.A., Young C.M.D., Billett S.M., Giles L.A. Pairing behaviour, reproduction and diet in the deep-sea holothurian genus *Paroriza* (Holothurioidea: Synallactidae) // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1992. Vol. 72.2. P. 447–462.

309. Uthicke S., Benzie J.A.H. Restricted gene flow between *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) populations along the north-east coast of Australia and the Solomon Island // *Marine Ecology Progress Series*. 2001. Vol. 216. P. 109–117.

310. Uthicke S., Benzie J.A.H. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: Mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-pacific // *Molecular Ecology*. 2003. Vol. 12. P. 2635–2648.

311. Valente S., Serrão E.A., González-Wangüemert M. West versus East Mediterranean Sea: origin and genetic differentiation of the sea cucumber *Holothuria polii* // *Marine Ecology*. 2014. Vol. 36, №3. P. 485-495.

312. Vences M., Thomas M., van der Meijden A., Chiari Y., Vieites D.R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians // *Frontiers in Zoology*. 2005. Vol. 2. P. 1–12.

313. Vendrami D.L.J., Peck L.S., Clark M.S., Eldon B., Meredith M., Hoffman J.I. Sweepstake reproductive success and collective dispersal produce chaotic genetic patchiness in a broadcast spawner // *Science Advances*. 2021. Vol. 7., №37. Article no. eabj4713

314. Wagner A.P., Creel S., Kalinowski S.T. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles // *Heredity*. 2006. Vol. 97. P. 336–345.

315. Wang B., Jiang J., Xie F., Chen X., Dubois A., Liang G. et al. Molecular phylogeny and genetic identification of populations of two species of feirana frogs (Amphibia: Anura, Ranidae, Dicroglossinae, Paini) endemic to China // *Zoological Science*. 2009. Vol. 26. P. 500–509.

316. Wang J. The computer program STRUCTURE for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse // *Molecular Ecology Resources*. 2017. Vol. 17, №5. P. 981-990.

317. Wang J., Cong W., Jiang Y., Zhang J. Effects of benthic diatom species and density on settlement and ontogenetic development of feeding organs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Journal of Dalian Ocean University*. 2010. Vol. 25, №4. P. 232–298.

318. Wang T., Sun L., Chen M. Aestivation and regeneration // *The sea cucumber *Apostichopus japonicus*. History, biology and aquaculture* / eds. Yang H., Hamel J.-F., Mercier A. Academic Press, 2015. P. 177–210.

319. Wang W., Ma C., Ouyang L., Chen W., Zhao M., Zhang F. et al. Genetic diversity and population structure analysis of *Lateolabrax maculatus* from Chinese

coastal waters using polymorphic microsatellite markers // Scientific Reports. 2021. Vol. 11. Article no. 15260.

320. Waples R.S., Gaggiotti O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15. P. 1419–1439.

321. Wares J.P., Gaines S.D., Cunningham C.W. A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary // Evolution. 2001. Vol. 55. P. 295–306.

322. Watts R.J., Johnson M.S., Black R. Effects of recruitment on genetic patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia // Marine Biology. 1990. Vol. 105. P. 145–151.

323. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. Vol. 38, №6. P. 1358–1370.

324. Weng Z. H., Xie Y.J., Xiao Z.Q., Wang Z.Y. Gui J.F. Microsatellite and mitochondrial DNA analysis of the genetic structure of Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) in southeast China coast // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12, №16. P. 2088-2099.

325. Wolstenholme D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution // International Review of Cytology. 1992. Vol. 141. P. 173–216.

326. Wright S. Evolution in Mendelian populations // Genetics. 1931. Vol. 16. P. 97–159.

327. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. 1965. Vol. 19. P. 395–420.

328. Wu C.-H., Drummond A. Joint inference of microsatellite mutation models, population history and genealogies using transdimensional Markov Chain Monte Carlo // Genetics. 2011. Vol. 188. P. 151–164.

329. Wu H.L., Wan Q. H., Fang S.G. Population structure and gene flow among wild populations of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) based on mitochondrial DNA control region sequences // Zoological Science. 2006. Vol. 23. P. 333–340.

330. Wu X., Wang L., Zhang D., Wen Y. Microsatellite null alleles affected population genetic analyses: a case study of Maire yew (*Taxuschinensis* var. *mairei*) // Journal of Forest Research. 2019. Vol. 24, №3. P. 1-5.

331. Xu S., Luosang J., Hua S., He J., Ciren A., Wang W. et al. High-altitude adaptation and phylogenetic analysis of Tibetan horse based on the mitochondrial genome // Journal of Genetics and Genomics. 2007. Vol. 34. P. 720–729.

332. 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.

333. Yan J., Jing J., Mu X., Du H., Tian M., Wang S. et al. A genetic linkage map of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on microsatellites and SNPs // Aquaculture. 2013. Vol. 404-405. P. 1–7.

334. Yang L., Tan Z., Wang D., Xue L., Guan M.-X., Huang T. et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis // Scientific Reports. 2014. Vol. 4. Article no. 4089.

335. Yeh F.C., Yang R-C., Boyle T.B.J., Ye Z-H., Mao J.X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [Электронный ресурс]. 1997. Режим доступа: <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>

336. Yujiao H., Huichun X., Gonghua L., Tongzuo Z., Jianping S., Yurong D. Population structure of Plateau Pika based on mitochondrial DNA and microsatellite analysis // Pakistan Journal of Zoology. 2022. Vol. 54, №2. P. 503-511.

337. Zaslavskaya N.I., Vashchenko M.A., Zhadan P.M. The genetic structure of populations of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from the northwestern Sea of Japan in connection with a shift in spawning time // Russian Journal of Marine Biology. 2012. Vol. 38. P. 325–338.

338. Zhan A., Bao Z., Lu W., Hu X., Peng W., Wang M. et al. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) // Molecular Ecology Notes. 2007. Vol. 7. P. 1345-1348.

339. Zhang Y.P., Ryder O.A. Phylogenetic relationships of bears (the Ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1994. Vol. 3. P. 351–359.

340. Zhao H. Taxonomy and identification // *The sea cucumber *Apostichopus japonicus*. History, biology and aquaculture* / eds. Yang H., Hamel J.-F., Mercier A. Academic Press, 2015. P. 37–52.

341. Zouros E., Foltz D.W. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs // *Malacologia*. 1984. Vol. 25. P. 581–591.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица

Вариабельные сайты последовательностей фрагмента гена *COI* мтДНК, выявленные в гаплотипах *Apostichopus japonicus*

Гаплотипы	Фрагменты генов и сайты нуклеотидных замен																				
	46	58	76	79	112	127	139	193	208	214	229	253	259	284	328	337	352	358	397	412	490
H1
H2	G	.
H3	C
H4	T	T
H5	C	.	.	.	G
H6	.	.	C
H7	.	T	.	T	A	A	.	.	.	T
H8	G	T	.	T	A	.	.	.	T
H9	.	T	.	T	.	.	T	A	.	.	.	T
H10	C	A	G	.	.	C	.	.
H11	.	T	.	T	G	.	.	.	A	.	.	.	T
H12	A
H13	A	T	.	.	.	C
H14	.	T	.	T	A	A	.	.	.	T	C	.	.	.
H15	.	T	C	T	A	A	.	.	.	T
H16	.	T	.	T	T	A	A	.	.	.	T

Примечание. Полужирным шрифтом выделены филогенетически информативные сайты нуклеотидных замен. Точками обозначены одинаковые позиции.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Таблица

Последовательности фрагмента гена *COI* мтДНК, используемые в исследовании в соответствии с гаплотипами

№	№ гаплотипа, соответствующий таблице	Место сбора	Присвоенные № в NCBI
1	H1	зал. Восток	OP077239
2	H2	зал. Восток	OP077240
3	H3	зал. Восток	OP077241
4	H4	зал. Восток	OP077242
5	H5	зал. Восток	OP077243
6	H6	зал. Восток	OP077244
7	H7	зал. Восток	OP077245
8	H8	зал. Восток	OP077246
9	H9	зал. Восток	OP077247
10	H10	зал. Восток	OP077248
11	H11	зал. Восток	OP077249
12	H12	Амурский зал.	OP077250
13	H13	зал. Посъета	OP077251
14	H14	зал. Посъета	OP077252
15	H15	зал. Посъета	OP077253
16	H16	зал. Посъета	OP077254

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Таблица

Частоты аллелей 10 микросателлитных локусов в выборках *Apostichopus japonicus* без корректировки генотипов.
Размеры фрагментов приведены в парах нуклеотидов.

Локус	Фрагмент	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18	Локус	Фрагмент	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
AJ20333	172	-	-	-	-	0.020	Psj2889	235	0.095	0.024	0.056	0.019	0.042
	178	-	-	-	-	0.020		237	0.238	0.381	0.208	0.315	0.313
	185	-	-	-	0.019	-		239	0.083	0.048	0.097	0.111	0.083
	188	0.012	-	-	0.037	-		241	0.083	0.119	0.097	0.167	0.146
	191	0.083	-	-	0.204	-		243	0.024	0.048	0.208	0.056	0.125
	197	-	0.114	0.013	-	-		245	0.024	0.024	0.042	0.019	-
	203	0.131	0.091	0.205	0.056	0.120		249	0.012	-	-	-	-
	206	0.417	-	0.038	0.074	0.080	Psj2409	196	0.025	-	-	-	0.077
	209	0.298	0.659	0.577	0.463	0.560		198	-	0.025	-	-	-
	212	0.012	-	0.013	-	0.020		200	0.013	-	0.013	0.019	-
	214	0.012	-	-	-	-		202	0.025	-	0.013	-	0.019
	215	0.036	0.136	0.141	0.111	0.180		204	0.175	0.375	0.372	0.333	0.173
	218	-	-	0.013	0.037	-		206	0.188	0.075	0.154	0.130	0.135
AJ10675	201	0.060	0.068	0.013	-	0.063	208	0.388	0.450	0.385	0.333	0.558	
	204	0.119	-	-	0.354	-	210	0.038	0.025	-	0.037	-	
	207	0.345	0.341	0.276	-	0.229	212	-	-	-	0.037	-	
	210	0.381	-	-	0.646	0.021	214	0.050	0.050	0.026	-	0.019	
	213	0.095	0.591	0.711	-	0.688	218	0.038	-	-	0.037	-	
AJ13361	180	-	-	-	0.052	-	220	0.038	-	0.013	-	-	

ПРИЛОЖЕНИЕ III (продолжение)

	181	-	0.024	0.038	0.190	-		222	0.025	-	0.026	0.056	0.019
	184	0.073	0.095	-	0.052	0.040		232	-	-	-	0.019	-
	187	0.220	0.357	0.808	0.603	0.460		174	-	-	0.013	0.036	-
	190	0.707	0.524	0.154	0.103	0.460		178	0.014	-	-	-	-
	193	-	-	-	-	0.040		180	0.014	-	-	-	0.091
PS205	169	0.061	0.024	-	0.086	0.020	Psj2464	182	0.028	-	-	-	-
	171	-	-	0.013	0.017	-		184	0.028	-	-	-	-
	173	0.220	0.143	0.090	0.138	0.200		186	0.014	-	0.013	0.018	0.023
	175	0.488	0.643	0.513	0.483	0.420	Psj2464	188	0.097	0.150	0.077	0.250	0.364
	177	0.012	0.048	0.038	-	0.080		190	0.306	0.325	0.321	0.196	0.114
	179	0.012	0.024	-	-	-		192	0.458	0.350	0.577	0.232	0.114
	183	0.037	0.071	0.128	0.086	0.120		194	0.014	-	-	0.018	0.045
	185	0.098	0.024	0.179	0.155	0.100		196	0.014	0.075	-	0.071	0.068
	187	0.012	-	0.038	-	0.040		198	0.014	0.100	-	0.179	0.182
	191	-	0.024	-	-	-		FCS9	155	0.063	-	0.056	0.054
	195	0.061	-	-	0.017	0.020	157		-	-	0.028	0.036	-
	201	-	-	-	0.017	-	159		0.313	0.025	0.194	0.357	0.019
	197	0.023	0.050	0.051	0.019	-	161		0.188	0.025	0.069	0.125	-
199	0.023	0.050	-	-	-	163	0.025		-	0.014	0.036	-	
Psj1828	203	0.209	0.125	0.179	0.204	0.115	3S16	169	0.213	0.600	0.375	0.232	0.596
	205	-	-	-	-	0.058		171	0.188	0.250	0.236	0.161	0.327
	207	0.012	-	-	-	0.019		173	0.013	0.075	0.028	-	0.058
	209	-	-	-	-	0.096		181	-	0.025	-	-	-
	213	0.105	0.275	0.128	0.222	0.096		227	0.038	-	-	0.125	-
	215	0.070	0.100	0.090	-	0.038	229	0.100	-	-	-	-	
	219	0.453	0.300	0.436	0.352	0.519	231	-	-	-	0.146	-	
	221	0.047	-	0.051	0.093	0.058	233	0.100	0.200	0.097	0.146	0.146	

ПРИЛОЖЕНИЕ III (продолжение)

	223	0.058	-	0.064	0.093	-	235	0.163	0.100	0.056	0.333	0.313
	229	-	0.050	-	-	-	247	-	0.025	0.014	0.021	0.042
	231	-	-	-	0.019	-	249	0.038	-	0.139	0.021	0.104
	237	-	0.050	-	-	-	251	0.025	-	0.014	-	-
Psj2889	221	0.250	0.214	0.222	0.185	0.146	253	0.088	0.175	0.181	0.021	0.063
	229	0.012	0.024	0.028	0.037	0.021	255	0.288	0.275	0.306	0.167	0.208
	231	0.143	0.095	0.042	0.093	0.125	257	0.163	0.225	0.181	0.021	0.125
	233	0.036	0.024	0.000	0.000	0.000	259	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Таблица

Частоты аллелей 10 микросателлитных локусов в выборках *Apostichopus japonicus* с корректировкой генотипов. Размеры фрагментов приведены в парах нуклеотидов.

Локус	Фрагмент	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18	Локус	Фрагмент	Vos	Krs	Pos15	Fed	Pos18
AJ20333	172	-	-	-	-	0.020	Psj2889	235	0.095	0.024	0.056	0.019	0.042
	178	-	-	-	-	0.020		237	0.238	0.381	0.208	0.315	0.313
	185	-	-	-	0.025	-		239	0.083	0.048	0.097	0.111	0.083
	188	0.020	-	-	0.050	-		241	0.083	0.119	0.097	0.167	0.146
	191	0.060	-	-	0.175	-		243	0.024	0.048	0.208	0.056	0.125
	197	-	0.114	0.013	-	-		245	0.024	0.024	0.042	0.019	-
	203	0.140	0.091	0.205	0.075	0.120		249	0.012	-	-	-	-
	206	0.420	-	0.038	0.100	0.080		196	0.025	-	-	-	0.077
	209	0.260	0.659	0.577	0.375	0.560		198	-	0.025	-	-	-
	212	0.020	-	0.013	-	0.020		200	0.013	-	0.013	0.019	-
	214	0.020	-	-	-	-		202	0.025	-	0.013	-	0.019
	215	0.060	0.136	0.141	0.150	0.180		204	0.175	0.375	0.372	0.333	0.173
218	-	-	0.013	0.050	-	206	0.188	0.075	0.154	0.130	0.135		
AJ10675	201	0.060	0.068	0.013	-	0.063	Psj2409	208	0.388	0.450	0.385	0.333	0.558
	204	0.119	-	-	0.354	-		210	0.038	0.025	-	0.037	-
	207	0.345	0.341	0.276	-	0.229		212	-	-	-	0.037	-
	210	0.381	-	-	0.646	0.021		214	0.050	0.050	0.026	-	0.019
	213	0.095	0.591	0.711	-	0.688		218	0.038	-	-	0.037	-
AJ13361	180	-	-	-	0.052	-	220	0.038	-	0.013	-	-	
	181	-	0.024	0.038	0.190	-	222	0.025	-	0.026	0.056	0.019	
	184	0.073	0.095	-	0.052	0.067	232	-	-	-	0.019	-	

ПРИЛОЖЕНИЕ IV (продолжение)

	187	0.220	0.357	0.808	0.603	0.433	Psj2464	174	-	-	0.013	0.036	-		
	190	0.707	0.524	0.154	0.103	0.433		178	0.014	-	-	-	-		
	193	-	-	-	-	0.067		180	0.014	-	-	-	0.091		
PS205	169	0.061	0.024	-	0.086	0.020	Psj2464	182	0.028	-	-	-	-		
	171	-	-	0.013	0.017	-		184	0.028	-	-	-	-		
	173	0.220	0.143	0.090	0.138	0.200		186	0.014	-	0.013	0.018	0.023		
	175	0.488	0.643	0.513	0.483	0.420		188	0.097	0.150	0.077	0.250	0.364		
	177	0.012	0.048	0.038	-	0.080		190	0.306	0.325	0.321	0.196	0.114		
	179	0.012	0.024	-	-	-		192	0.458	0.350	0.577	0.232	0.114		
	183	0.037	0.071	0.128	0.086	0.120		194	0.014	-	-	0.018	0.045		
	185	0.098	0.024	0.179	0.155	0.100		196	0.014	0.075	-	0.071	0.068		
	187	0.012	-	0.038	-	0.040		198	0.014	0.100	-	0.179	0.182		
	191	-	0.024	-	-	-		155	0.063	-	0.056	0.054	-		
	195	0.061	-	-	0.017	0.020		157	-	-	0.028	0.036	-		
	201	-	-	-	0.017	-		159	0.313	0.025	0.194	0.357	0.019		
	Psj1828	197	0.023	0.077	0.051	0.019		-	FCS9	161	0.188	0.025	0.069	0.125	-
		199	0.023	0.077	-	-		-		163	0.025	-	0.014	0.036	-
203		0.209	0.115	0.179	0.204	0.118	169	0.213		0.600	0.375	0.232	0.596		
205		-	-	-	-	0.088	171	0.188		0.250	0.236	0.161	0.327		
207		0.012	-	-	-	0.029	173	0.013		0.075	0.028	-	0.058		
209		-	-	-	-	0.088	181	-		0.025	-	-	-		
213		0.105	0.192	0.128	0.222	0.088	227	0.060		-	-	0.125	-		
215		0.070	0.154	0.090	-	0.059	229	0.080		-	-	-	-		
219		0.453	0.231	0.436	0.352	0.441	231	-		-	-	0.146	-		
221		0.047	-	0.051	0.093	0.088	233	0.080		0.200	0.097	0.146	0.146		
223		0.058	-	0.064	0.093	-	235	0.180		0.100	0.056	0.333	0.313		
229		-	0.077	-	-	-	247	-		0.025	0.014	0.021	0.042		
							3S16								

ПРИЛОЖЕНИЕ IV (продолжение)

	231	-	-	-	0.019	-	249	0.060	-	0.139	0.021	0.104
	237	-	0.077	-	-	-	251	0.040	-	0.014	-	-
Psj2889	221	0.250	0.214	0.222	0.185	0.146	253	0.100	0.175	0.181	0.021	0.063
	229	0.012	0.024	0.028	0.037	0.021	255	0.260	0.275	0.306	0.167	0.208
	231	0.143	0.095	0.042	0.093	0.125	257	0.140	0.225	0.181	0.021	0.125
	233	0.036	0.024	-	-	-	259	-	-	0.014	-	-

ПРИЛОЖЕНИЕ V

Таблица

Матрица генетических расстояний (K2p-дистанции, под диагональю) и стандартная ошибка (S.E., над диагональю)

между исследуемыми гаплотипами *Apostichopus japonicus* по фрагменту гена *COI* мтДНК

№	Гаплотип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	H1		0.0536	0.0560	0.0872	0.0874	0.0537	0.2321	0.2267	0.2384	0.1684	0.2264	0.0590	0.1275	0.2556	0.3041	0.3186
2	H2	0.0500		0.0859	0.1273	0.1256	0.0832	0.2903	0.3088	0.3025	0.2316	0.2972	0.0867	0.1703	0.3048	0.3548	0.3804
3	H3	0.0500	0.1057		0.1285	0.1215	0.0862	0.2719	0.2801	0.3023	0.2180	0.2729	0.0925	0.1730	0.2976	0.3599	0.3539
4	H4	0.1057	0.1682	0.1682		0.1670	0.1189	0.2294	0.2207	0.2215	0.2937	0.2295	0.1239	0.1229	0.2571	0.2988	0.1689
5	H5	0.1057	0.1682	0.1682	0.2398		0.1210	0.3716	0.3764	0.3651	0.1691	0.3632	0.1313	0.2347	0.3859	0.4357	0.4405
6	H6	0.0500	0.1057	0.1057	0.1682	0.1682		0.3041	0.3022	0.3008	0.2410	0.2848	0.0878	0.1680	0.3194	0.2321	0.3647
7	H7	0.3233	0.4236	0.4236	0.3233	0.5493	0.4236		0.0914	0.0841	0.5158	0.0895	0.3102	0.2943	0.0528	0.0537	0.0549
8	H8	0.3233	0.4236	0.4236	0.3233	0.5493	0.4236	0.1057		0.0852	0.5202	0.0870	0.3211	0.3108	0.1146	0.1271	0.1297
9	H9	0.3233	0.4236	0.4236	0.3233	0.5493	0.4236	0.1057	0.1057		0.5234	0.0825	0.3118	0.3001	0.1041	0.1200	0.1208
10	H10	0.2398	0.3233	0.3233	0.4236	0.2398	0.3233	0.9730	0.9730	0.9730		0.5225	0.2314	0.3589	0.5203	0.5571	0.5685
11	H11	0.3233	0.4236	0.4236	0.3233	0.5493	0.4236	0.1057	0.1057	0.1057	0.9730		0.2975	0.2982	0.1120	0.1245	0.1252
12	H12	0.0500	0.1057	0.1057	0.1682	0.1682	0.1057	0.4236	0.4236	0.4236	0.3233	0.4236		0.1708	0.3229	0.3749	0.3686
13	H13	0.1682	0.2398	0.2398	0.1682	0.3233	0.2398	0.4236	0.4236	0.4236	0.5493	0.4236	0.2398		0.3177	0.3612	0.3693
14	H14	0.3960	0.5076	0.5076	0.3960	0.6514	0.5076	0.0494	0.1610	0.1610	1.2007	0.1610	0.5076	0.5076		0.0774	0.0781
15	H15	0.4236	0.5493	0.5493	0.4236	0.7175	0.3233	0.0500	0.1682	0.1682	1.5223	0.1682	0.5493	0.5493	0.1021		0.0866
16	H16	0.4236	0.5493	0.5493	0.2398	0.7175	0.5493	0.0500	0.1682	0.1682	1.5223	0.1682	0.5493	0.5493	0.1021	0.1057	

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Таблица

Матрица генетических расстояний (p -дистанции, под диагональю) и стандартная ошибка (S.E., над диагональю)
между исследуемыми гаплотипами *Apostichorus japonicus* по фрагменту гена *COI* мтДНК

№	Гаплотип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	H1		0.0450	0.0487	0.0646	0.0633	0.0435	0.0916	0.0925	0.0912	0.0870	0.0931	0.0467	0.0777	0.0976	0.0973	0.0966
2	H2	0.0476		0.0642	0.0761	0.0732	0.0621	0.0985	0.0984	0.0976	0.0917	0.0981	0.0619	0.0880	0.1037	0.1036	0.1023
3	H3	0.0476	0.0952		0.0766	0.0771	0.0631	0.0975	0.0977	0.0962	0.0981	0.0987	0.0657	0.0855	0.1023	0.1016	0.1006
4	H4	0.0952	0.1429	0.1429		0.0870	0.0775	0.0913	0.0927	0.0905	0.0992	0.0935	0.0753	0.0768	0.0974	0.0983	0.0844
5	H5	0.0952	0.1429	0.1429	0.1905		0.0759	0.1015	0.1036	0.1018	0.0859	0.1015	0.0767	0.0933	0.1048	0.1061	0.1049
6	H6	0.0476	0.0952	0.0952	0.1429	0.1429		0.0973	0.0969	0.0965	0.0925	0.0991	0.0629	0.0838	0.1018	0.0916	0.1025
7	H7	0.2381	0.2857	0.2857	0.2381	0.3333	0.2857		0.0632	0.0623	0.1042	0.0619	0.0975	0.0996	0.0456	0.0435	0.0467
8	H8	0.2381	0.2857	0.2857	0.2381	0.3333	0.2857	0.0952		0.0641	0.1061	0.0605	0.0967	0.1002	0.0767	0.0735	0.0756
9	H9	0.2381	0.2857	0.2857	0.2381	0.3333	0.2857	0.0952	0.0952		0.1045	0.0635	0.0965	0.1013	0.0747	0.0738	0.0722
10	H10	0.1905	0.2381	0.2381	0.2857	0.1905	0.2381	0.4286	0.4286	0.4286		0.1070	0.0952	0.1030	0.1065	0.1052	0.1041
11	H11	0.2381	0.2857	0.2857	0.2381	0.3333	0.2857	0.0952	0.0952	0.0952	0.4286		0.0977	0.1012	0.0757	0.0745	0.0746
12	H12	0.0476	0.0952	0.0952	0.1429	0.1429	0.0952	0.2857	0.2857	0.2857	0.2381	0.2857		0.0870	0.1011	0.1024	0.1008
13	H13	0.1429	0.1905	0.1905	0.1429	0.2381	0.1905	0.2857	0.2857	0.2857	0.3333	0.2857	0.1905		0.1027	0.1020	0.1034
14	H14	0.2857	0.3333	0.3333	0.2857	0.3810	0.3333	0.0476	0.1429	0.1429	0.4762	0.1429	0.3333	0.3333		0.0610	0.0643
15	H15	0.2857	0.3333	0.3333	0.2857	0.3810	0.2381	0.0476	0.1429	0.1429	0.4762	0.1429	0.3333	0.3333	0.0952		0.0645
16	H16	0.2857	0.3333	0.3333	0.1905	0.3810	0.3333	0.0476	0.1429	0.1429	0.4762	0.1429	0.3333	0.3333	0.0952	0.0952	