

УДК 575.174.015.3

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНЫХ ЛОКУСОВ У ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА *APOSTICHOPUS JAPONICUS* (SELENKA, 1867) (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA) В ВЫБОРКАХ ИЗ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2022 г. В. Д. Ягодина¹, *, Н. М. Батищева¹, В. А. Брыков¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

*e-mail: iagodinavd@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2022 г.

После доработки 25.04.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

На 122 особях из пяти выборок (зал. Петра Великого, Японское море) с применением пяти микросателлитных маркеров исследовано генетическое разнообразие дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*. Все локусы полиморфны; среднее значение наблюдаемой гетерозиготности для всех выборок и локусов составило 0.461 ± 0.027 , ожидаемой гетерозиготности — 0.575 ± 0.031 . Значения коэффициента инбридинга в среднем были выше 0, что обусловлено дефицитом гетерозигот. Для некоторых микросателлитных локусов выявлены нуль-аллели. После их обнаружения исправлены ошибки генотипирования и проведена корректировка статистических данных, которая показала, что присутствие нулевых аллелей в 1.5–2 раза снижало значение наблюдаемой гетерозиготности и вело к отклонению от равновесия Харди–Вайнберга.

Ключевые слова: *Apostichopus japonicus*, микросателлиты, нулевые аллели, генетическая изменчивость

DOI: 10.31857/S0134347522050102

Дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) широко распространен в прибрежных водах Восточной Азии, включая Японию, Китай, Северную и Южную Корею, а также Дальний Восток России (Chang et al., 2009). Этот вид имеет значительную коммерческую ценность и является одним из важнейших объектов аквакультуры, поскольку обладает высоким содержанием ценных питательных веществ, витаминов и минералов, а также рядом характерных биологически и фармакологически биоактивных соединений; способность *A. japonicus* к регенерации делает его важным объектом с медицинской точки зрения (Oh et al., 2017).

Для описания генетической изменчивости и структуры популяций дальневосточного трепанга применяются и разрабатываются в основном микросателлитные маркеры (Kanno et al., 2006; Chen et al., 2013) и однонуклеотидные полиморфизмы (Du et al., 2012; Dong et al., 2016). К основным преимуществам микросателлитных маркеров относят высокий уровень изменчивости как следствие высокой скорости накопления мутаций, кодоминантный тип наследования и легкую пробоподготовку. Недостатками микросателлитов считают появление “теневых полос”, или “за-

иканий” (Галинская и др., 2019), когда каждый аллель представляет собой серию фрагментов, кратных длине повторяющейся единицы микросателлита вследствие “проскальзывания” при репликации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также гомоплазию и наличие нулевых аллелей (Abdul-Muneer, 2014).

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 — предпочтительная амплификация коротких аллелей из-за непостоянства качества или количества матрицы ДНК (Chapius, Estoup, 2007), а также проскальзывание ДНК-полимераза во время амплификации (Ellegren, 2004). Наличие нулевых аллелей приводит к появлению ложных гомозигот, которые влияют на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга и ведут, как следствие, к некорректной интерпретации результатов (Carlsson, 2008).



Рис. 1. Карта-схема мест сбора материала.

С использованием микросателлитных маркеров проведены исследования генетической структуры и разнообразия *A. japonicus* из зал. Тояма (Япония) (Soliman et al., 2012). Изучение данной голотурии из разных локальностей побережья Южной Кореи показало применимость выбранных авторами микросателлитных локусов для генетического анализа (Kim et al., 2008). При исследовании популяций дальневосточного трепанга только в работе Канно с коллегами (Kanno et al., 2006) были определены нулевые аллели и проведена работа по корректировке этих ошибок генотипирования.

Большая часть работ в российской литературе посвящена изучению биологии и образа жизни дальневосточного трепанга, а также процессов, связанных со снижением его численности (Селин, 2001; Гаврилова, 2013; Лысенко и др., 2018). Исследования по определению популяционной структуры и уровней генетического разнообразия *A. japonicus* на Дальнем Востоке России не проводились.

Цель настоящей работы – оценка генетической изменчивости у трепанга *A. japonicus* с помощью микросателлитных локусов в выборках из зал. Петра Великого Японского моря, а также изучение распределения выявленных нуль-аллелей и оценка их влияния на интерпретацию популяционных данных с использованием разных популяционно-генетических подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследовано пять выборок трепанга *Apostichopus japonicus*, собранных водолазным способом в зал. Петра Великого Японского моря в 2015 и 2018 гг.: зал. Восток (Vos, n = 28, июль 2015 г.), мыс Красный, Амурский залив (Krs, n = 20, июнь 2015 г.), зал. Посьета (Pos15, n = 34, июль 2015 г.), б. Федорова, Амурский залив (Fed, n = 26, июнь 2015 г.) и зал. Посьета (Pos18, n = 22, июль 2018 г.). Две выборки из зал. Посьета (3 и 5) были взяты с интервалом в три года в одной и той же локальности (рис. 1).

Геномную ДНК из фиксированной в 96% этаноле ткани выделяли методом щелочного лизиса (Truett, 2006). Выборки трепанга были проанализированы по пяти микросателлитным локусам. В полимеразной цепной реакции использовали праймеры, представленные в табл. 1. К 5'-концу каждого прямого праймера был пришит хвост M13 (в табл. 1 указан мелким шрифтом), который был помечен одним из четырех флуоресцентных красителей: ROX, 6FAM, R6G или TAMRA.

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей дистиллированную воду, 10X буфер (Евроген), dNTP (содержание каждого дезоксирибонуклеотида 5 мМ), прямой праймер (5 мМ), обратный праймер (5 мМ), флуоресцентный краситель (5 мМ), Taq ДНК-полимеразу (5000 ед., Евроген) – 0.1 мкл и ДНК – 40–60 нг. Конечный объем реак-

Таблица 1. Используемые для анализа выборки трепанга *Apostichopus japonicus* локусы, праймеры и исследуемый повтор

№	Локус	Последовательности праймеров (5'-3')	Повтор	Размер без праймера (пн)
1	AJ10675	F: TGGAAACAGCTATGACCATGAGATGTCAGCCACATGCAAC R: GGTAAGCTTGTGGGAATGGA	(TAG) ₅	185–190
2	AJ13361	F: TGGAAACAGCTATGACCATGTGGAAGACGAAGATGAGCAA R: GGAATGACCCTACGTCCAAA	(CAG) ₅	165–205
3	AJ20333	F: TGGAAACAGCTATGACCATGCGTCGACCAAAGAGAGCAAT R: TCCCTGGACTGGCACTAATC	(AGT) ₇	181–198
4	AJ20385	F: TGGAAACAGCTATGACCATGAGCAAACCACCGAGTACACC R: CTCCACCACTCTCCGATTCT	(CAA) ₅	187–205
5	AJ21199	F: TGGAAACAGCTATGACCATGTACGCCTTTTGTCCGTTTTCT R: TGCAAGGCACAATTCTAAAAGA	(CTA) ₆	162–216

Примечание. Мелким шрифтом указан пришитый к 5'-концу каждого прямого праймера хвост M13, который был помечен одним из четырех флуоресцентных красителей ROX, 6FAM, R6G или TAMRA.

ции составлял 13 мкл. Условия для ПЦР были следующими: начальная денатурация при 94° в течение 3 мин; далее для 30 циклов денатурация при 94° – 45 с, отжиг (60°) – 30 с, элонгация (72°) – 2 мин; завершающая элонгация (72°) – 5 мин.

Продукт ПЦР проверяли с помощью гелеэлектрофореза в 1.5% агарозном геле; 1 мкл ПЦР-смеси добавляли в смесь для генотипирования, содержащую формамид и размерный стандарт (S450) (COGrDIS), затем подвергали электрофорезу на секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems). Длину фрагментов в полученных продуктах ПЦР визуализировали с помощью программы GeneMapper ver. 5.0 (Applied Biosystems).

Для генетической характеристики локусов определяли частоту аллелей в каждом локусе с использованием пакета GenAIEx версии 6.5.1 (Peakall, Smouse, 2012). При помощи программы “Arlequin” версии 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010) рассчитывали наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, коэффициент инбридинга (F_{IS}), а также проводили тест на соответствие ожиданиям Харди–Вайнберга (P) с использованием метода цепей Маркова. Коэффициент инбридинга с корректировкой данных по нулевым аллелям рассчитывали при помощи ПМ-модели (байесовский подход) с 50000 итерациями, значением burn-in в 10000 итераций в программе INEST 2.2 (Chybicki, Burczyk, 2009).

Частоты нулевых аллелей оценивали в следующих программах: FreeNA (Chapius, Estoup, 2007) в соответствии с алгоритмом максимизации ожиданий (EM-алгоритм – Expectation-maximization algorithm) Демпстера, Лэрда и Рубина (Dempster et al., 1977); INEST 2.2 – при помощи ПМ подхода (байесовский подход) с количеством циклов в 50000 и значением burn-in в 10000; модель выбора включала нуль-аллели, инбридинг и ошибки генотипирования; MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) – исходя из пропорций Харди–Вайнберга, частоты нулевых аллелей оценены и скорректированы в соответствии с методами, разработанными Ван Остерхоутом (Van Oosterhout et al., 2004).

Если частота нулевого аллеля меньше или равна 0.1, некоторые оценки можно использовать напрямую без корректировки; если она больше или равна 0.5, эффективность оценки слишком мала и такой локус следует исключить (Huang et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая изменчивость трепанга

В исследованных выборках все локусы оказались полиморфными, частоты аллелей характеризовались значительной изменчивостью. Размер аллелей варьировал от 172 до 219 п. н. Всего обнаружено 36 аллелей по всем локусам, среднее число аллелей на локус составило 7.2.

Для пяти выборок трепанга по каждому локусу были рассчитаны основные статистические показатели, необходимые для интерпретации полученных результатов. Наибольшие различия в значениях H_o и H_e отмечены в двух локусах трех выборок: в группе особей из зал. Восток в локусе AJ20333; в выборках из зал. Посыета, отобранных в 2015 и 2018 гг., показатели также различались по локусу AJ13361. Средние для всех выборок и локусов значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составили 0.439 ± 0.032 и 0.563 ± 0.030 соответственно (табл. 2).

Средние значения генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам представлены в табл. 3. Для всех выборок наблюдаемая гетерозиготность была меньше ожидаемой, значение F_{IS} для популяций Vos, Pos15 и Pos18 было больше 0.2.

Влияние нулевых аллелей на генетическое разнообразие трепанга

Частота нулевых аллелей по отдельным локусам в индивидуальных выборках, рассчитанная в программе MICRO-CHECKER, варьировала от -0.2957 до 0.7928 . Частота нуль-аллелей в программе FreeNA изменялась от 0 до 0.3207; результаты программы INEST 2.2 по определению частоты нулевых аллелей варьировали от 0.0250 до 0.4580.

В программе MICRO-CHECKER обнаружены нулевые аллели в пяти локусах для всех выборок трепанга, которые нуждались в корректировке генотипов (см. приложение). После корректировки генотипов по методу Ван Остерхоута получены значения H_o , H_e и F_{IS} для локусов с нуль-аллелями (табл. 4).

Сравнение данных без коррекции и с коррекцией генотипов показывает сильное изменение коэффициента инбридинга. Так, для особей из зал. Восток F_{IS} по локусу AJ20333 без учета нулевых аллелей он составил 0.612, а с их учетом – 0.379; для особей из зал. Посыета, собранных в 2018 г., F_{IS} был равен соответственно 0.758 и 0.515.

Средние значения генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам с учетом нуль-аллелей представлены в табл. 5. Значения коэффициента инбридинга, полученные в программе INEST 2.2, скорректированы исходя из частоты нулевых аллелей.

Средние значения H_o и H_e до и после корректировки значительно различались, наблюдаемая гетерозиготность была меньше ожидаемой. Коэффициент инбридинга, полученный после корректировки генотипов в программе MICRO-CHECKER и с учетом нуль-аллелей в программе INEST 2.2, различался для некоторых выборок более чем на 0.1.

Таблица 2. Характеристика генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus*

Выборка	Локус	Ho	He	F _{IS}	P
Vos	AJ20333	0.250	0.627	0.612	0.006**
	AJ20385	0.500	0.642	0.232	0.849
	AJ10675	0.571	0.595	0.040	0.000***
	AJ13361	0.333	0.503	0.343	0.011*
	AJ21199	0.571	0.780	0.275	0.037*
Krs	AJ20333	0.538	0.440	-0.235	0.623
	AJ20385	0.538	0.714	0.253	0.647
	AJ10675	0.438	0.353	-0.250	0.263
	AJ13361	0.455	0.593	0.242	0.072
	AJ21199	0.500	0.700	0.300	0.009**
Pos15	AJ20333	0.607	0.571	-0.064	0.907
	AJ20385	0.375	0.492	0.242	0.030*
	AJ10675	0.355	0.337	-0.054	0.694
	AJ13361	0.065	0.567	0.888	0.000***
	AJ21199	0.536	0.682	0.218	0.067
Fed	AJ20333	0.467	0.671	0.312	0.123
	AJ20385	0.750	0.633	-0.200	0.436
	AJ10675	0.522	0.464	-0.128	0.472
	AJ13361	0.417	0.543	0.237	0.002**
	AJ21199	0.600	0.747	0.206	0.044*
Pos18	AJ20333	0.526	0.595	0.118	0.000***
	AJ20385	0.300	0.514	0.423	0.001**
	AJ10675	0.133	0.129	-0.037	0.782
	AJ13361	0.182	0.723	0.758	0.003**
	AJ21199	0.444	0.464	0.045	0.601
Среднее для всех выборок и локусов		0.439 ± 0.032	0.563 ± 0.030	0.175 ± 0.228	

Примечание. Здесь и в таблицах 3–5: 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).

Таблица 3. Средние значения генетической изменчивости по всем локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus*

Выборка	N	Ho	He	F _{IS}
Vos	15.2	0.445	0.629	0.301
Krs	12.2	0.494	0.560	0.107
Pos15	28.4	0.387	0.530	0.246
Fed	16.0	0.551	0.612	0.085
Pos18	14.8	0.317	0.485	0.261

Примечание. N – число особей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая изменчивость дальневосточного трепанга

При использовании микросателлитных локусов для исследования популяционно-генетической структуры видов возникает вопрос о необходимом и достаточном числе локусов. Некоторые исследователи считают, что, чем их больше, тем лучше. Однако показано, что для изучения размера популяции дикого кабана (Kolodziej et al., 2012) число маркёров можно сократить до четырех без изменения результата; в работе по определению минимального количества микросателлитных локусов, необходимых для оценки генетической структуры популяции (Arthofer et al., 2018), генети-

Таблица 4. Характеристика генетической изменчивости по пяти микросателлитным локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus* с учетом нулевых аллелей

Выборка	Локус	Ho	He	F _{IS}	P
Vos	AJ20333	0.250	0.627	0.612	0.006**
	AJ20333	0.429	0.670	0.379	0.040*
Pos15	AJ13361	0.065	0.567	0.888	0.000***
	AJ13361	0.154	0.674	0.779	0.000***
Pos18	AJ20385	0.300	0.514	0.423	0.001**
	AJ20385	0.375	0.599	0.381	0.009**
	AJ13361	0.182	0.723	0.758	0.003**
	AJ13361	0.400	0.778	0.515	0.339
Среднее для всех выборок и локусов		0.461 ± 0.027	0.575 ± 0.031	0.200 ± 0.270	

Примечание. Серым цветом отмечены данные, скорректированные по нуль-аллелям в программе MICRO-CHECKER.

Таблица 5. Средние значения генетической изменчивости по всем локусам в пяти исследованных выборках трепанга *Apostichopus japonicus* с учетом нуль-аллелей

Выборка	N	Ho	He	F _{IS}	F _{IS} ИМ
Vos	15.2	0.481	0.638	0.254	0.1132 (0–0.2919)
Krs	12.2	0.494	0.560	0.107	0.0794 (0–0.2162)
Pos15	28.4	0.405	0.551	0.224	0.0860 (0–0.2097)
Fed	16	0.551	0.612	0.085	0.1056 (0–0.2359)
Pos18	14.8	0.376	0.513	0.204	0.1001 (0–0.2833)

Примечание. F_{IS}ИМ – коэффициент инбридинга, скорректированный по нулевым аллелям в программе INEST 2.2; в скобках – 95% доверительный интервал.

ческая дифференциация групп особей определяется даже при использовании всего двух локусов. Наше исследование является предварительной оценкой генетического разнообразия дальневосточного трепанга в зал. Петра Великого (Японское море) с изучением влияния нулевых аллелей на полученные данные, поэтому использование пяти локусов можно считать достаточным.

Согласно полученным результатам, среднее значение Ho для всех выборок *Apostichopus japonicus* из зал. Петра Великого и локусов составило 0.439 ± 0.032 , He = 0.563 ± 0.030 . В других работах наблюдаемая гетерозиготность была также меньше ожидаемой: Ho = 0.378, He = 0.850 (Chang et al., 2009) и Ho = 0.537, He = 0.634 (Kanno et al., 2006), при этом особи были взяты из разных районов Японского моря и побережья Тихого океана. В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2008) указано, что Ho = 0.576, He = 0.761; авторы связывают это с недостатком гетерозигот. В целом можно говорить о дефиците гетерозигот для изучаемых групп особей *A. japonicus*.

Во всех исследованных нами выборках значения F_{IS} были выше нуля, что согласуется со значениями Ho и He. В работах других авторов этот коэффициент также имел положительные значения:

для нескольких особей из зал. Петра Великого, собранных у г. Владивостока, F_{IS} = 0.523 (Chang et al., 2009); для популяций трепанга из б. Тояма F_{IS} = 0.347 (Soliman et al., 2012), а для трепанга из побережья Южной Кореи F_{IS} = 0.260 (Kim et al., 2008).

В нашем случае отклонение от равновесия Харди–Вайнберга выявлено в каждой выборке *A. japonicus*: для Krs минимально – в локусе AJ21199, а для Vos – во всех локусах, кроме AJ20385. В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2008) по исследованию популяционной структуры дальневосточного трепанга у берегов Южной Кореи 8 из 9 локусов демонстрировали отклонение от равновесия Харди–Вайнберга. При изучении *A. japonicus*, отловленного в водах Японии, Южной Кореи, Китая и Дальнего Востока России, Чанг с соавторами (Chang et al., 2009) отметили, что для выбранных локусов в 85% случаев наблюдалось отклонение от равновесия. В работе южнокорейских ученых (An et al., 2013) для дикой популяции трепанга показана такая же ситуация с отклонением от равновесия Харди–Вайнберга по выбранным маркерам.

Возможными причинами различия 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 трепанга (Chang et al., 2009). Дефицит гетерозигот для дикой популяции трепанга Ан с соавторами (An et al., 2013) объясняют наличием нераспознанных нулевых аллелей, естественным отбором, действующим на генетические маркеры, близкородственным скрещиванием и возможным эффектом Валунда, а также сочетанием этих причин. Авторы другой работы (см.: Chen et al., 2008) значительные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга для дикой популяции трепанга связывают с большим количеством нулевых аллелей, что частично объясняет недостаток гетерозигот.

Дефицит гетерозигот в нашем случае может быть обусловлен антропогенными факторами, когда при искусственном разведении для воспроизводства используется ограниченное количество особей. Однако хозяйств марикультуры в Приморье немного и их влияние на генетические параметры естественных популяций крайне незначительно.

Более существенной причиной может быть незаконный (браконьерский) лов трепанга, который в последние десятилетия сказывается на естественных популяциях. В акватории Приморья ведется наблюдение за изменением численности этой голотурии. В частности, в 2014 и 2018 гг. состояние его популяции оценено в Дальневосточном морском заповеднике (Лысенко и др., 2015, 2018). Было показано, что численность *A. japonicus* после запрещения браконьерского промысла стабилизировалась и дальневосточный трепанг не находится под угрозой исчезновения. Однако в настоящее время средняя плотность поселений этой голотурии приблизительно в 20 раз ниже, чем до начала незаконного вылова (Лысенко и др., 2018). При снижении численности особей в акваториях снижается и эффективный размер популяции, затрудняется поиск партнеров для размножения, а это приводит к повышению уровня инбридинга.

Другой причиной отклонения от равновесия Харди–Вайнберга может быть присутствие нулевых аллелей, влияние которых обсуждается ниже.

Влияние нуль-аллелей на генетические данные

Все использованные программы рассчитывают частоты нулевых аллелей и корректируют один или несколько статистических показателей. Рассчитанные частоты нуль-аллелей во всех программах были приблизительно одинаковы.

В программе FreeNA оценка частоты нулевых аллелей для каждого локуса и популяции проводится в соответствии с EM-алгоритмом (Dempster

et al., 1977). С помощью этой программы можно не только оценивать частоту нуль-аллелей, но и корректировать долю изменчивости в субпопуляции по отношению к общей генетической изменчивости, так как показано, что присутствие нулевых аллелей влияет на генетическую дистанцию между популяциями (Chapius, Estoup, 2007).

Основное назначение INEST 2.2 – оценка коэффициента инбридинга, исходя из оценок наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности с поправкой на нулевые аллели. Программа предлагает два подхода (Chybicki, Burczyk, 2009): PIM (модель популяционного инбридинга, или максимальная вероятность) и PIM (модель индивидуального инбридинга, или байесовский подход). Подсчет коэффициента инбридинга возможен только для всех локусов в рамках одной выборки, вычисление F_{IS} для отдельного локуса не проводится.

MICRO-CHECKER рассчитывает частоту нулевых аллелей по методам, описанным Чакаборти с соавторами (Chakraborty et al., 1992) и Брукфилдом (Brookfield, 1996) с использованием двух уравнений, а также Ван Остерхоутом с соавторами (Van Oosterhout et al., 2004). Особенностью программы является корректировка генотипов после обнаружения нулевых аллелей. При этом пользователь самостоятельно может выбрать метод оценки нуль-аллелей, с помощью которого будет произведено исправление генотипов. На основе наших данных в MICRO-CHECKER нулевые аллели определены в случаях, когда величины наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности значительно различались (для локусов AJ20333 выборки Vos, AJ13361 выборки Vos, Pos15 и Pos18, AJ20385 группы особей выборки Pos18).

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 до и после коррекции большинство результатов не различалось из-за большого количества локусов, использованных в этом исследовании.

В нашей работе нулевые аллели выявлены не во всех локусах и не во всех исследованных выборках трепанга. Из пяти микросателлитных локусов три локуса (AJ13361, AJ2033, AJ20385) показали наличие нулевых аллелей в разных группах. В целом присутствие нулевых аллелей в 1.5–2 раза снижало значение наблюдаемой гетерозиготности и вело к отклонению от равновесия Харди–Вайнберга. Для локуса AJ13361 в популяции Pos18 после корректировки генотипов отклонение от равновесия не отмечено. Следовательно,

не во всех случаях равновесие Харди–Вайнберга нарушено из-за дефицита гетерозигот, на него влияют также ошибки генотипирования.

При сравнении коэффициентов инбридинга для средних значений генетической изменчивости с корректировкой по нуль-аллелям и без нее данные с исправленными генотипами демонстрировали меньшие величины, более близкие к 0. Рассчитанный в двух разных программах (MICRO-CHECKER и INEST 2.2) F_{IS} с учетом нуль-аллелей по всем локусам для некоторых выборок различался более чем на 0.2. Различие значений связано с тем, что INEST 2.2 корректирует коэффициент инбридинга даже при минимальных частотах нуль-аллелей, в то время как MICRO-CHECKER корректирует генотипы только для тех локусов, для которых частота нулевых аллелей превышает допустимый уровень с учетом методов подсчета.

Проверка наличия и эффекта нуль-аллелей на разные генетические параметры с использованием определенных аналитических инструментов проведена в некоторых исследованиях (Kalinowski, Taper, 2006; Chapius, Estoup, 2007; Girard, 2011; De Meeûs, 2018), однако лишь в немногих из них эмпирически проверено это влияние (Girard, Angers, 2008; Dąbrowski et al., 2015; Rico et al., 2017). Опубликованы 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).

Таким образом, в настоящее время проблема нулевых аллелей решается разными способами: меняется дизайн праймеров, корректируются частоты аллелей и генотипов на основе предполагаемых частот нулевых аллелей; иногда определенные локусы исключают из популяционного анализа. 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.

Частота нулевых аллелей для пяти локусов выборок трепанга *Apostichopus japonicus* по данным статистических программ

Локус	Программа						Наличие нуль-аллелей
	FreeNA	INEST 2.2	MICRO-CHECKER				
			Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	
Vos							
AJ20333	0.2306	0.3262	0.2599	0.4122	0.2191	0.7301	Да
AJ20385	0.0412	0.1536	0.0920	0.0922	0.0634	0.8126	Нет
AJ10675	0.0061	0.0586	0.0179	0.0079	0.0057	0.2120	Нет
AJ13361	0.1073	0.1254	0.1617	0.1912	0.1057	0.2891	Да

На основе полученных результатов для дальнейшей работы с применением данного типа маркеров мы планируем использовать MICRO-CHECKER с возможностью выбора метода оценки нуль-аллелей и их корректировки. Данный подход поможет избежать исключения локусов с наиболее часто встречаемой ошибкой генотипирования, что особенно актуально для видов, не являющихся промысловыми объектами. Для подсчета коэффициента инбридинга для всех локусов в рамках одной выборки мы рекомендуем программу INEST 2.2; при использовании программы FreeNA можно не только оценивать частоту, но и скорректировать генетическую дистанцию между популяциями с учетом нуль-аллелей.

Применение статистических подходов при изучении популяционной генетики *A. japonicus*, в частности генетического разнообразия и генетической дифференциации данной голотурии, мы считаем необходимым шагом на пути к оценке состояния диких популяций дальневосточного трепанга, который является важным промысловым объектом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Е.И. Бондарь (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН), И.Я. Чибицкому (Университет им. Казимира Великого, Польша) и М.Я. Домбровски (Музей и Институт зоологии Польской академии наук) за помощь в работе.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Локус	Программа						Наличие нуль-аллелей
	FreeNA	INEST 2.2	MICRO-CHECKER				
			Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	
AJ21199	0.1214	0.1169	0.1124	0.1368	0.1033	0.5931	Нет
Krs							
AJ20333	0.0000	0.0266	-0.2957	-0.1200	-0.0811	0.5001	Нет
AJ20385	0.0556	0.0436	0.1190	0.1208	0.0877	0.5512	Нет
AJ10675	0.0000	0.0300	-0.2500	-0.1228	-0.0713	0.3589	Нет
AJ13361	0.1108	0.0734	0.0719	0.1093	0.0712	0.6468	Нет
AJ21199	0.0921	0.0888	0.1100	0.1351	0.0943	0.7788	Нет
Pos15							
AJ20333	0.0000	0.0307	-0.0553	-0.0393	-0.0294	0.2816	Нет
AJ20385	0.0501	0.0749	0.1303	0.1246	0.0721	0.4899	Нет
AJ10675	0.0000	0.0578	-0.0375	-0.0341	-0.0176	0.1912	Нет
AJ13361	0.3207	0.3220	0.3814	0.7928	0.3169	0.4073	Да
AJ21199	0.0885	0.0985	0.0979	0.1116	0.0806	0.3359	Нет
Fed							
AJ20333	0.0948	0.0603	0.1502	0.1633	0.1105	0.5911	Нет
AJ20385	0.0000	0.0395	-0.168	-0.1163	-0.098	0.7771	Нет
AJ10675	0.0000	0.0250	-0.0796	-0.0698	-0.0468	0.1238	Нет
AJ13361	0.0959	0.0375	0.0965	0.1217	0.0754	0.0754	Нет
AJ21199	0.1008	0.0579	0.0538	0.0840	0.0643	0.7526	Нет
Pos18							
AJ20333	0.0240	0.1051	0.0348	0.0476	0.0333	0.2983	Нет
AJ20385	0.1540	0.1945	0.1812	0.2512	0.1341	0.3132	Да
AJ10675	0.0000	0.2760	-0.0691	-0.0345	-0.0079	0.5443	Нет
AJ13361	0.3069	0.4580	0.3361	0.5829	0.3007	0.7748	Да
AJ21199	0.0000	0.1946	0.0317	-0.007	-0.0043	0.7474	Нет

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гаврилова Г.С. Товарное выращивание дальневосточного трепанга // Владивосток: ТИПРО-Центр. 2013. 99 с.

Галинская Т.В., Щенетов Д.М., Лысенков С.Н. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 617–632. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060043>

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 // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 2. С. 146–149.

Лысенко В.Н., Жариков В.В., Лебедев А.М., Долганов С.М. Современное состояние популяции дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* в Дальневосточном морском заповеднике // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 2. С. 133–139.

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

Abdul-Muneer P.M. Application of microsatellite markers in conservation and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genet. Res. Int. 2014. V. 2014. Art. ID 691759.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997932>. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>

An H.S., Lee J.W., Hong S.W. et al. 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 Genomics. 2013. V. 35. P. 709–717. <https://doi.org/10.1007/s13258-013-0139-8>

Arthofer W., Heussler C., Krapf P. et al. Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: a case study in fly culturing // Fly. 2018. V. 12. № 1. P. 13–22. <https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1396400>

Brookfield J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // Mol. Ecol. 1996. V. 5. P. 453–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00336.x>

Carlsson J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing // J. Hered. 2008. V. 99. № 6. P. 616–623. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn048>

Chakraborty R., de Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // Ann. Hum. Genet. 1992. V. 56. P. 45–57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1992.tb01128.x>

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 // Mar. Ecol.

2009. V. 30. P. 455–461.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00292.x>
- Chapuis M.-P., Estoup A.* Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 621–631.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Chen L., Li Q., Yang J.* Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. P. 1541–1549.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02027.x>
- Chen M., Gao L., Zhang W. et al.* Identification of forty-five gene-derived polymorphic microsatellite loci for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [Электронный ресурс] // *J. Genet.* 2013. V. 92. Art. e31–35.
<http://www.ias.as.in/jgenet/OnlineResources/92/e31.pdf>.
<https://doi.org/10.1007/s12041-013-0234-2>
- Chybicki I., Burezyk J.* Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients // *J. Hered.* 2009. V. 100. № 1. P. 106–113.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esn088>
- Dąbrowski M.J., Bornelöv S., Kruczyk M. et al.* 'True' null allele detection in microsatellite loci: a comparison of methods, assessment of difficulties and survey of possible improvements // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15. № 3. P. 477–488.
- Dakin E.E., Avise J.C.* Microsatellite null alleles in parentage analysis // *Heredity.* 2004. V. 93. № 5. P. 504–509.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
- De Meeüs T.* Revisiting Fis, Fst, Wahlund effects, and null alleles // *J. Hered.* 2018. V. 109. № 4. P. 446–456.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esx106>
- Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B.* Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm // *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1977. V. 39. № 1. P. 1–38.
<https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x>
- 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* // *J. World Aquacult. Soc.* 2016. V. 47. № 6. P. 873–888.
<https://doi.org/10.1007/s12686-013-9858-z>
- Du H., Bao Z., Yan J. et al.* Development of 101 gene-based single nucleotide polymorphism markers in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 7080–7097.
<https://doi.org/10.3390/ijms13067080>
- Ellegren H.* Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nat. Rev. Genet.* 2004. V. 5. P. 435–445.
<https://doi.org/10.1038/nrg1348>
- 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 // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Girard P.* A robust statistical method to detect null alleles in microsatellite and SNP datasets in both panmictic and inbred populations // *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2011. V. 10. Art. 9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21381434/>.
<https://doi.org/10.2202/1544-6115.1620>
- Girard P., Angers B.* Assessment of power and accuracy of methods for detection and frequency-estimation of null alleles // *Genetica.* 2008. V. 134. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1007/s10709-007-9224-8>
- Grimaldi M.-C., Crouau-Roy B.* Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences // *J. Mol. Evol.* 1997. V. 44. P. 336–340.
<https://doi.org/10.1007/PL00006151>
- Huang K., Ritland K., Dunn D.W. et al.* Estimating relatedness in the presence of null alleles // *Genetics.* 2016. V. 202. P. 247–260.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.163956>
- Kalinowski S.T., Taper M.L.* Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci // *Conserv. Genet.* 2006. V. 7. P. 991–995.
<https://doi.org/10.1007/s10592-006-9134-9>
- Kanno M., Suyama J., Li Q., Kijima A.* Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants // *Mar. Biotechnol.* 2006. V. 8. P. 672–685.
<https://doi.org/10.1007/s10126-006-6014-8>
- Kim M., Choi T., An H.S.* Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. P. 1038–1045.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01962.x>
- Kolodziej K., Theissing K., Brün J. et al.* Determination of the minimum number of microsatellite markers for individual genotyping in wild boar (*Sus scrofa*) using a test with close relatives // *Eur. J. Wildl. Research.* 2012. V. 58. P. 621–628.
<https://doi.org/10.1007/s10344-011-0588-9>
- 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* // *J. Hered.* 2011. V. 102. № 2. P. 243–246.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esq123>
- Oh G.-W., Ko S.-C., Lee D.H. et al.* Biological activities and biomedical potential of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): a review // *Fish. Aquat. Sci.* 2017. V. 20. Art. 28.
<https://doi.org/10.1186/s41240-017-0071-y>
- Peakall R., Smouse P.E.* GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rico C., Cuesta J.A., Drake P. et al.* Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*) // *PeerJ.* 2017. V. 5. Art. ID e3188.
<https://peerj.com/articles/3188/>.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3188>
- Selenka E.* Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien // *Z. Wiss. Zool.* 1867. V. 17. P. 291–374.
- 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 // *Fish. Sci.* 2012. V. 78. P. 775–783.
<https://doi.org/10.1007/s12562-012-0509-1>
- Truett G.E.* Preparation of genomic DNA from animal tissues // *DNA sequencing II: Optimizing preparation and cleanup.* Boston: Jones and Bartlett Publishers. 2006. Ch. 3. P. 33–46.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.* MICRO-CHECKER: software for identifying and cor-

recting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. P. 535–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Variation at Nuclear Loci in the Japanese Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Echinodermata: Holothuroidea) in Samples from Peter the Great Bay, Sea of Japan

V. D. Yagodina^a, N. M. Batishcheva^a, and V. A. Brykov^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The genetic diversity of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* was assessed using five microsatellite markers. A total of 122 specimens of sea cucumber from five samples collected in Peter the Great Bay (Sea of Japan) were examined. All loci were polymorphic. For all samples and loci, the average value of the observed heterozygosity was 0.461 ± 0.027 , the expected heterozygosity was 0.575 ± 0.031 . The values of the inbreeding coefficient were, on average, greater than zero due to the deficiency of heterozygotes. Null alleles were identified for some microsatellite loci. After their detection, genotyping errors and statistical data were corrected. The presence of null alleles caused a 1.5–2-fold decrease in the value of observed heterozygosity and led to deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium.

Keywords: *Apostichopus japonicus*, microsatellites, null alleles, genetic variability