

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
НАЗЕМНОЙ БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ» ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ВОРОНОВА АНАСТАСИЯ НИКОЛАЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
СВЯЗИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИДОВ ТРЕМАТОД
РОДА *NANORHYNCHUS* CHAPIN, 1926
(ТРЕМАТОДА: ТРОГЛОТРЕМАТИДАЕ)**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор,
Челомина Галина Николаевна

ВЛАДИВОСТОК – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Биология, жизненные циклы и патогенность трематод из рода <i>Nanophyetus</i>	15
1.2. Использование маркеров ядерной ДНК для молекулярно-генетических исследований трематод.....	22
1.3. Использование маркеров митохондриальной ДНК для молекулярно- генетических исследований трематод.....	27
1.4. Пространственная организация биомолекул	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1. Получение паразитологического материала	43
2.2. Выделение геномной ДНК.....	45
2.3. Амплификация ДНК	45
2.4. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК.....	51
2.5. Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей	52
2.6. Статистическая обработка данных.....	53
2.7. Реконструкция демографической истории популяций	56
2.8. Моделирование вторичных структур транскриптов рДНК.....	58
2.9. Определение предполагаемой структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы.....	58
2.10. Филогенетический анализ	58
2.11. Датировка дивергентных событий	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	62
3.1. Анализ рибосомного кластера	62
3.1.1. Нуклеотидные последовательности ДНК	62
3.1.2. Вторичные структуры транскриптов спейсерных участков рДНК	74
3.1.3. Вторичные структуры вариабельных участков 18S рРНК.....	82
3.1.4. Филогенетические связи трематод.....	94

3.2. Анализ гена <i>nad1</i> мтДНК	102
3.2.1. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена	102
3.2.2. Характеристика полноразмерного гена <i>nad1 N. schikhobalowi</i>	102
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	133
4.1. Особенности распределения генетического разнообразия внутри и между видами рода <i>Nanophyetus</i>	133
4.2. Пространственные структуры биомолекул	138
4.3. Филогения рода <i>Nanophyetus</i>	151
4.4. Филогеография и демографическая история популяций <i>Nanophyetus</i>	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	164
ВЫВОДЫ	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	169
ПРИЛОЖЕНИЯ I - VIII.....	204 - 218

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная ДНК

М – моль

мкл – микролитр

млн.л.н. – миллионов лет назад

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

об/мин – оборотов в минуту

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рибосомная ДНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

яДНК – ядерная ДНК

BI – Bayesian Inference – Байесовский вывод (анализ/подход)

CBC – Compensatory Base Change – компенсаторная замена оснований

COX1 – Cytochrome oxidase subunit I – первая субъединица цитохромоксидазы

ES – Expansion Segment – вариабельный участок

GC-состав/содержание – гуанин-цитозиновый состав (%)

GenBank – база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков

hemi-CBC – hemi-Compensatory Base Change – полукомпенсаторная замена оснований

ITS – Internal Transcribed Spacer – регион внутреннего транскрибируемого спейсера, состоящий из двух спейсерных участков (ITS1 и ITS2) и гена 5,8S ядерной рДНК

ML – Maximum Likelihood – метод максимального правдоподобия

NADH-дегидрогеназа – Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase – никотинамидадениндинуклеотид дегидрогеназа

SPD – salmon poisoning disease – болезнь отравления лососем

TBE – Tris/ Borate/ EDTA - buffer – трис-боратный ЭДТА – буфер

Ts – транзиции

Tv – трансверсии

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Паразитизм возник на самых ранних этапах развития жизни на Земле. Являясь с биологической точки зрения прогрессивным явлением как наиболее выгодный в энергетическом и физиологическом аспектах способ существования живых организмов, он получил чрезвычайное распространение в природе. Паразиты составляют около 40% (Kuris et al., 2008) от всех видов животных, значительно превышая численность видового состава их позвоночных хозяев (Lefebvre et al., 2009). Особенности биологии, глобальное распространение, высокое разнообразие и изобилие паразитов практически во всех экосистемах позволяют им играть ключевые роли во многих экологических и эволюционных процессах, включая биологическую диверсификацию и видообразование, что представляет большой интерес для фундаментальных генетических исследований (Lefebvre et al., 2009; Tompkins et al., 2010; Wood, Johnson, 2015).

В настоящее время глобальное изменение климата сопровождается значительными изменениями в фаунистических комплексах паразитов людей и животных (Ebert, 1994; Lively, Dybdahl, 2000; Sorensen, Minchella, 2001; Wang et al., 2006; Гопко, Михеев, 2017). Поэтому исследования по таксономической идентификации видов, особенно имеющих высокое эпидемиологическое значение, и оценке их внутривидового генетического разнообразия, чрезвычайно актуальны. Разнообразные продукты питания являются источниками инфекции для человека, сюда относятся рыбы, пресноводные и морские моллюски (в том числе устрицы). Рыба – это ценный пищевой продукт, но по официальным данным, речная рыба все чаще является причиной зараженности людей трематодами. Российский Дальний Восток характеризуются наличием возбудителей гельминтозов, не встречающихся больше нигде в России. Эндемичными по клонорхозу (*Clonorchis sinensis*), метагонимозу (*Metagonimus yokogawai*) (Tatonova et al., 2012), парагонимозу (*Paragonimus westermani*) и нанофиедозу (*Nanophyetus schikhobalowi*) (Беспрозванных, Ермоленко, 2005)

являются Приамурье (территория, охватывающая левобережный бассейн среднего и нижнего течения реки Амур) и Приморское Приуссурье (в пределах бассейнов озера Ханка и реки Раздольная). Для жителей юга Дальнего Востока России эти водоемы являются излюбленными местами рыбной ловли и отдыха, что обуславливает высокую вероятность инфицирования населения возбудителями гельминтозов.

Нанофиетоз – опасное зоонозное заболевание, вызываемое трематодами из рода *Nanophyetus* Chapin, 1927 (Digenea: Troglotremtidae), распространенное в странах тихоокеанского региона, где осуществляется циркуляция паразита: Канаде, Соединенных Штатах Америки, России и Японии. Заражение возбудителем может достигать 82% среди домашних плотоядных животных и 17,6% среди диких хищников, с интенсивностью до 19000 червей на животное (Драгомерецкая и др., 2014а). В России нанофиетоз встречается чаще у жителей деревень и у коренных народностей Приамурья (эвенки, нивхи), заражение среди которых может достигать 95 – 98% (Драгомерецкая и др., 2014б). В США кишечные инфекции, вызванные *N. salmincola*, были зарегистрированы в Орегоне, Вашингтоне и Калифорнии у людей, которые употребляли, недоваренный или домашнего копчения лосось (John, Petri, 2006). Болезнь характеризуется дискомфортом в области живота, сопровождающимся тошнотой и рвотой, хронической диареей, усталостью, эозинофилией периферической крови, потерей веса (Harrel, Deardorff, 1990). В Северной Америке нанофиетоз связывают с тяжелым системным заболеванием у собак, называемым «болезнью отравления лососем» (англ. salmon poisoning disease, SPD), обычно без лечения приводящее к летальному исходу, и рыбьим гриппом или мором лососей (англ. fish flu) (Millemann, Knapp, 1970), причиной которых является бактерия *Neorickettsia helminthoeca*, использующая *N. salmincola* в качестве вектора (Vaughan et al., 2012). Недавно было продемонстрировано, что *N. salmincola* переносит не менее двух дополнительных видов *Neorickettsia*, патогенных для плотоядных животных

(Vaughan et al., 2012). До сих пор о симбиозе неориккетсий и *N. schikhobalowi* не сообщалось.

Для удобства изложения далее по тексту представителей евразийской (Дальний Восток России), азиатской (Японские острова) и североамериканской (Соединенные Штаты Америки) популяций *Nanophyetus* spp. именовали *Nanophyetus schikhobalowi*, *Nanophyetus japonensis* и *Nanophyetus salmincola* соответственно.

Степень разработанности темы. Несмотря на широкое распространение, медицинское и ветеринарное значение, внутривидовая таксономия *Nanophyetus* spp. остается неразрешенной. Род включает 4 номинальных вида: *N. salmincola* (Charin, 1926), *N. schikhobalowi* Скрыбин и Подъяпольская, 1931, *N. asadai* Yamaguti, 1971 и *N. japonensis* Saito, Saito, Yamashita, Watanabe и Sekikawa, 1982. Из-за морфологического сходства *N. salmincola* и *N. schikhobalowi* их таксономический статус всегда находился под сомнением, и разные авторы в разное время считали этих трематод либо отдельными видами, либо одним видом, расселившимся по двум континентам. До настоящего времени *N. schikhobalowi* признавался синонимом *N. salmincola* или подвидом *N.s. schikhobalowi* (Bowman et al., 2008; Драгомерецкая, 2015). Тем не менее, попыток проверить это предположение с использованием методов молекулярной генетики не предпринималось.

Филогенетические реконструкции класса Trematoda выполнялись главным образом на неполных геномных и спейсерных последовательностях рибосомного кластера более 15 лет назад на ограниченном числе видов и без датировки дивергентных событий (Littlewood et al., 1999; 2001; Olson et al., 2003). Использование вторичных структур транскриптов рДНК, как дополнительного инструмента для анализа филогенетических связей представителей *Nanophyetus* и Trematoda в целом не применялось. В отличие от моногеной (Matejusova 2004) и цестод (Zhang et al., 2010, 2017), попыток моделирования переменных участков 18S рРНК трематод не предпринималось. Исследование внутривидовой генетической изменчивости было проведено только для *N. salmincola* с помощью

одного молекулярного маркера – последовательности гена *nad1* мтДНК (Criscione, Blouin, 2004). Филогеография и демографические истории видов *Nanophyetus* прежде не изучались. Вторичные и третичные структуры каких-либо белковых молекул для видов *Nanophyetus* не моделировались.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является оценка генетического разнообразия, реконструкция демографической истории и филогенетических связей представителей рода *Nanophyetus* Chapin, 1926 из трех географических регионов (Северной Америки, Российского Дальнего Востока и Японских островов).

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить полноразмерные последовательности генов (18S, 5,8S и 28S) и спейсеров (ITS1 и ITS2) рибосомного кластера (рДНК) и последовательности гена *nad1* митохондриальной ДНК (мтДНК) представителей *Nanophyetus* из разных географических регионов;
2. Оценить генетическое разнообразие региональных и локальных (из разных речных систем и разных видов рыб-хозяев) популяций *Nanophyetus* по данным нуклеотидной изменчивости маркеров ядерной рДНК и мтДНК;
3. Провести историко-демографический анализ региональных и локальных популяций *Nanophyetus* на основе данных генетического полиморфизма гена *nad1* мтДНК;
4. С учетом данных из GenBank реконструировать филогенетические связи представителей *Nanophyetus* на разных таксономических уровнях с оценкой времени дивергенции основных филогенетических линий;
5. Смоделировать вторичные структуры транскриптов ITS1, ITS2 и переменных участков 18S рДНК представителей *Nanophyetus* с локализацией на них консервативных (структурных и функциональных) мотивов;
6. Основываясь на данных генных последовательностей смоделировать вторичную и третичную структуры первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*;

7. По совокупности полученных данных дать заключение по таксономическому статусу региональных популяций *Nanophyetus* spp.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые детально изучаются особенности организации генетического разнообразия трех видов трематод рода *Nanophyetus* (*N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*) на основе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генов (18S, 5,8S и 28S) и спейсерных (ITS1 и ITS2) участков рДНК, частичной и полной последовательности гена мтДНК (*nad1*), кодирующего первую субъединицу NADH-дегидрогеназы, а также вторичных структур переменных участков 18S рРНК и транскриптов ITS спейсеров рДНК. Впервые для трематод реконструированы схемы вторичной и третичной структур прогнозируемого белка NADH1 дегидрогеназы (на примере *N. schikhobalowi*), а также вторичных структур 9 переменных участков 18S рРНК для 65 видов отряда Plagiorchiida. Установлены филогенетические связи видов *Nanophyetus* на разных таксономических уровнях с датировкой дивергентных событий. Впервые для представителей рода *Nanophyetus* реконструированы демографические истории региональных (видовых) и локальных географических популяций, а также популяционных выборок из различных видов рыб-хозяев. Установлены последовательность и время формирования основных эволюционных линий *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, получены генетические свидетельства их видовой самостоятельности.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты настоящей работы, полученные с помощью современных методов анализа молекулярно-генетических данных, вносят существенный вклад в исследование генетического разнообразия трематод в целом и представителей рода *Nanophyetus* в частности, их филогении и филогеографии, а также паразито-хозяйинных отношений. Во время исследования определены и депонированы в международную базу данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) 60 новых нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК и 73 последовательности генов и спейсеров рДНК. Полученные результаты важны для прогнозирования

эпидемиологической ситуации на Дальнем Востоке России, практического применения в сельском хозяйстве и медицинских исследованиях, включая развитие молекулярной диагностики и создание противогельминтных препаратов нового поколения.

Материалы диссертации можно использовать в общих и специальных курсах лекций для бакалавров и магистров биологических направлений ВУЗов.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной диссертационной работе применены методы классической паразитологии и современные методы молекулярной генетики и биоинформатики. Амплификацию выбранных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР. Получение нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера. Анализ данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения и статистических программ. Филогенетические деревья реконструированы с использованием метода максимального правдоподобия (ML), метода объединения ближайших соседей (NJ) и байесовского вывода (BI) в программах MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) и MrBayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Возможные варианты мутационных переходов между гаплотипами мтДНК рассчитаны и визуализированы с помощью метода медианных сетей (median joining) (Bandelt et al., 1999). Молекулярная датировка возникновения основных филогенетических линий у исследованных таксонов проведена на основе байесовского подхода в пакете программ BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Для реконструкции демографической истории популяций задействованы методы коалесцентного анализа. Вторичные структуры транскриптов рДНК моделировали в программах RNAalifold (Bernhart et al., 2008), RNAfold и Mfold 3.0 (Zuker, 2003). Выполнен поиск консервативных, теломерных и регуляторных мотивов. Для моделирования вторичных и третичных структур первой субъединицы NADH-дегидрогеназы использовали программу, доступную на портале PHYRE2 (Kelley et al., 2015).

Личный вклад автора. Экспериментальная часть молекулярно-генетических исследований и обработка данных были выполнены автором в полном объеме. Самостоятельно освоены различные программы для

филогенетического анализа данных в рамках исследования. Автор принимала участие в получении паразитологического материала, представлении результатов исследования на конференциях и в подготовке материалов для публикаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дигенетические сосальщики рода *Nanophyetus* (*N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*) являются самостоятельными видами.
2. Демографические истории популяций *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* разные: они включают плейстоценовую экспансию каждого вида в разные временные периоды без события бутылочного горлышка в недавнем прошлом.
3. Распределение внутривидового генетического разнообразия *N. schikhobalowi* имеет выраженную географическую и паразито-хозяйинную специфичность.
4. Вторичные структуры транскриптов рДНК дают ценную информацию для таксономической идентификации трематод и могут быть использованы для баркодинга.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена современными молекулярно-генетическими, филогенетическими и филогеографическими подходами, включая методы коалесценции и статистической обработки данных, а также методами биоинформатики, которые соответствуют целям и задачам, поставленным в работе. Использование одних и тех же алгоритмов и методов анализа с помощью разного программного обеспечения, а также повтор результатов при дополнительных экспериментах и достаточный объём выборок позволили всесторонне проанализировать полученные данные и определили точность реконструкций демографических и дивергентных событий. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы подкреплены данными, приведенными в таблицах, рисунках, диаграммах, гистограммах, и моделями вторичных структур.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на международном симпозиуме по геномной медицине «International Conference on Genomic Medicine», г. Балтимор, США (2017), на конференциях: «Генетика популяций: прогресс и перспективы», г. Москва (2017); «Modern achievements in population, evolutionary, and ecological genetics: International symposium», г. Владивосток (2015, 2017); конференции-конкурсе молодых ученых ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток (2014) и X международном экологическом форуме «Природа без границ», г. Владивосток (2016).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 7 научных работ: 3 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных действующим списком ВАК, 4 – тезисы научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 218 страницах, содержит 12 таблиц и 49 рисунков. Работа состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Заключения», «Выводов», «Списка литературы» и 8 Приложений. Список литературы содержит 330 источников, из них 290 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю искреннюю признательность научному руководителю д.б.н., профессору Челоминой Галине Николаевне за внимательное отношение, обучение и поддержку на всех этапах работы, заведующему лаборатории паразитологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, д.б.н. В.В. Беспрозванных за предоставленный паразитологический материал и помощь в подготовке диссертации, господину Ясуо Араки (Институт внутреннего рыболовства, префектура Ямагата), доктору Хидето Кино (Университет Хамамацу, префектура Сидзуока) и профессору Такеши Шимадзу (Адзумино, префектура Нагано) за паразитологический материал из Японии и методические указания, профессору В.В. Ткачу (Университет Северной Дакоты, США) за сотрудничество в изучении трематод Северной Америки, к.б.н. Е.В. Артюковой за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и критические замечания, к.б.н. Д.М. Атопкину за помощь в организации работы и консультации. Выражаю

искреннюю благодарность коллективу лаборатории паразитологии, своим родным и близким за всестороннюю и неоценимую поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биология, жизненные циклы и патогенность трематод из рода *Nanophyetus*

К дигенетическим сосальщикам или трематодам (Trematoda), относят облигатных паразитов внутренних органов позвоночных животных и человека, вызывающих трематодозы – заболевания, сопровождающиеся серьезными нарушениями здоровья, общим истощением организма и даже гибелью. Их организация крайне напоминает таковую турбеллярий, но со специфическими регрессивными чертами, имеющими важное приспособительное значение в процессе эволюционной адаптации (Гинецинская, Добровольский, 1978).

В роде *Nanophyetus* выделяют четыре номинальных вида, являющихся возбудителями гельминтоза – нанофиетоза. *Nanophyetus asadai* Yamaguti, 1971 и *Nanophyetus japonensis* описаны на территории Японии (Saito et al., 1982), *Nanophyetus salmincola* Chapin, 1926 и *Nanophyetus schikhobalowi* Skrjabin и Podiapolskaia, 1931 распространены по разные стороны Тихоокеанского побережья: в Северной Америке и на Дальнем Востоке России соответственно.

Систематическое положение червей рода *Nanophyetus*
(по Blair et al., 2008):

Тип Плоские черви – Plathelminthes Gegenbaur, 1859

Класс Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808

Подкласс Дигенетические сосальщики – Digenea Carus, 1863

Отряд Plagiorchiida La Rue, 1957

Подотряд Xiphidiata Olson, 2003

Надсемейство Gorgoderoidea Looss, 1901

Семейство Troglotrematidae Odhner, 1914

Род *Nanophyetus* Chapin, 1926

Типовой вид *Nanophyetus salmincola* Chapin, 1926

Нанофьетусы – мелкие черви (*Nanophyetus schikhobalowi* и *N. salmincola* имеют в длину 0,5 – 1,5 мм, в ширину 0,3 – 0,8 мм, а *N. japonensis* в длину 0,4 – 1,0 мм, ширину 0,2 – 0,5 мм) грушевидной формы. Тегумент покрыт микроскопическими шипами; на теле, как у всех дигенетических сосальщиков, расположены две присоски – ротовая и брюшная (Рисунок 1) (Беспрозванных, Ермоленко, 2005).



Рисунок 1 – Фотографии марит разных видов рода *Nanophyetus*: *N. schikhobalowi* (А) (предоставлено д.б.н. Беспрозванных В.В.); *N. japonensis* (Б) (предоставлено проф. Шимадзу Т.); *N. salmincola* (В) (из атласа по клинической паразитологии, <https://instruction.cvhs.okstate.edu/jcfox/htdocs/clinpara>).

Род *Nanophyetus* имеет сложную таксономическую историю, за время которой произошло немало изменений систематического положения, как самого рода, так и входящих в него видов. Чепин (Chapin, 1926) установил род *Nanophyes* для описанного им вида *Nanophyes salmincola*; черви впервые были выделены из тонкого кишечника собаки в Корваллисе, штат Орегон. В 1928 году он изменил название на *Nanophyetus salmincola* (Chapin, 1928). Во время первого описания род включили в семейство Heterophyidae Odhner, 1914. Несколько лет спустя, в 1931 году морфологически схожие трематоды – *Nanophyetus schikhobalowi*, выделенные из кишечника представителей коренного населения Приамурья, были описаны Скрябиным и Подъяпольской (Синович и Востриков, 1974). Хотя *N. schikhobalowi* отличался от *N. salmincola* по нескольким морфологическим

параметрам, в первую очередь, меньшими размерами яиц, Гебхардт (Gebhardt et al., 1966) пришел к выводу, что эти два вида являются синонимами. Этому же мнения придерживалось большинство исследователей. Позднее Филимонова присвоила евразийской форме статус подвида *N. salmincola schikhobalowi* (Филимонова, 1966). Кроме того, некоторые авторы считали род *Nanophyetus* синонимом *Troglorema* Odhner, 1914 (Kinne, 1980, Bowman et al., 2008). Так, из-за неоднозначных морфологических различий вопрос таксономического статуса номинальных видов в роде *Nanophyetus* оставался неразрешенным (Voronova et al., 2017).

Взрослые трематоды *Nanophyetus japonensis* были описаны Саито с соавторами (1982) из тонкого кишечника млекопитающих Японии: собаки, которая за 7 дней до этого была экспериментально заражена метацеркариями, выделенными из японского лосося *Salvelinus pluvius* Hilgendorf, 1876 (синоним *Salvelinus leucomaenis* Pallas, 1814 (Salmonidae)); барсуков *Meles anakuma* Temminck, 1844 (Carnivora: Mustelidae), пойманных в окрестностях города Каминояма, префектура Ямагата; и водных землероек *Chimarrogale platycephala* Temminck, 1842 (Soricomorpha: Soricidae), пойманных близ ручьев также в префектуре Ямагата (Saito et al., 1982). Голотип был получен из собаки, однако местонахождение его неизвестно. Взрослые особи нанофиетуса были обнаружены также в тонком кишечнике желтой куницы *Martes melampus* Wagner, 1841 (Mustelidae), японской ласки *Mustela itatsi* Temminck, 1844 (Mustelidae), енотовидной собаки *Nyctereutes procyonodes* Gray, 1834 (Carnivora: Canidae) из префектур Ямагата и Ниигата. Метацеркарии находили у четырех видов пресноводных рыб (*Tribolodon hakonensis* Sauvage, 1883, *Morocco steindachneri* и *Cottus pollux* Günther, 1873) и двух видов саламандр из префектуры Ямагата (*Hynobius lickensatus* Tschudi, 1838 и *Onychodactylus japonicus* Houttuyn, 1782).

Жизненные циклы нанофиетусов (*N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*) протекают с участием трех хозяев, двух промежуточных и одного окончательного. Первые промежуточные хозяева – брюхоногие моллюски родов *Juga*, *Parajuga* и *Semisulcospira*. Вторыми промежуточными хозяевами являются

многие представители рыб из подсемейств сиговых, хариусовых и лососевых: амурский сиг, амурский хариус, кета, горбуша, кижуч, чавыча, таймень, ленок и т.д. (Филимонова, 1963, 1964, 1966; Millemann, Knapp, 1970; Saito et al., 1982). Зараженность их тем выше, чем ближе ко дну водоемов обитают рыбы. При определенных условиях личинки могут заражать пресноводных рыб иной систематической принадлежности, например, голяна, амурских чебака, щуку, широколобку (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Яйца нанофиетусов развиваются до инвазионных стадий в воде при комнатной температуре в течение 5 мес, а промерзание воды ускоряет выход из яиц мирацидиев – реснитчатых личинок первого партеногенетического поколения.

Развитый мирацидий энергично движется внутри яйца, затем вылупляется и плавает в воде, пока не проникает в тело моллюска, где продолжает свое развитие, трансформируясь в материнскую спороцисту – вторую личиночную стадию (первое партеногенетическое поколение). Внутри спороцисты из зародышевых клеток развиваются десятки редий – третья личиночная стадия (второе партеногенетическое поколение). Когда материнская спороциста лопается, редии выходят в организм промежуточного хозяина (улитки) и принимаются активно поглощать его ткани. Они локализуются в основном в пищеварительной железе моллюсков. Внутри редий происходит развитие четвертой личиночной стадии – церкариев (их количество в одной редии может достигать более 70), представляющих личинку свободноживущего гермафродитного поколения.

Церкарии, вышедшие из моллюсков в воду, передвигаются по дну водоемов. Установлено, что на продолжительность их жизни сильно влияет температура воды (Филимонова, 1964, 1966). Так, при температуре 6°C время жизни, а соответственно и поиска хозяина достигает 1,5 месяцев. Продолжительность жизни церкарий нанофиетуса, возможно, одна из самых больших для свободно передвигающихся в воде личинок трематод (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Церкарии довольно быстро проникают в тело рыбы через любой участок кожи. Сначала они оседают на плавниках (у крупных

ленков и тайменей в огромных количествах, из-за чего плавники могут утолщаться и приобретать шероховатый вид), а затем продвигаются между их лучами и через кожу проникают в тело рыбы сначала передним концом, подтягивая задний. В тканях рыбы церкарии теряют хвост и инцистируются в течение 1 – 3,5 часов, превращаясь в метацеркарии (Гинецинская, 1958). Далее метацеркарии претерпевают метаморфоз и на 11 – 12-е сутки достигают инвазионной для окончательных хозяев стадии. Метацеркарии у мальков и сеголеток локализуются преимущественно в мышцах тела, глаз и сердца, тогда как у половозрелых рыб их больше обнаруживается в почках и в мышцах плавников, меньше – в жабрах, на стенках кишечника и в окружающей их жировой ткани. У тайменя, ленка, хариуса и ельца они найдены на поверхностных тканях чешуи, а интенсивнее всего заражены мышцы плавников, головы и почки. У кеты, щуки и ельца личинки чаще всего инцистированы в почках. В мышцах плавников личинки иногда образуют сплошные скопления, при высыхании напоминающие манную крупу, а в почках представляют собой массу серебристо-серого цвета и легко обнаруживаются невооруженным глазом (Мишаков, 1972а). Через кожный покров скопившиеся метацеркарии также видны невооруженным глазом (Мишаков, 1972а).

Окончательными хозяевами нанофиетусов являются плотоядные млекопитающие и птицы. В пищеварительном тракте под действием желудочного сока метацеркарии освобождаются от цист и проникают в передний отдел тонкого кишечника. Через 5 – 8 сут (в зависимости от видовой принадлежности окончательного хозяина от 5 – 8 до 24 сут) такая личинка достигает последней стадии развития – превращается в мариту (половозрелую гермафродитную особь), после чего начинает выделять яйца. Продолжительность жизни марит составляет от 18 сут до 2х мес (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Патогенное действие нанофиетусов заключается в повреждении слизистой оболочки тонкой кишки, которое вызывается прикрепляющимися к стенкам кишечника трематодами. Наблюдается гиперемия слизистой и появление на ней множественных кровоточащих эрозий и язв. Особенно сильны клинические проявления при

интенсивной инвазии – в среднем не менее 500 особей; тогда воспалительные изменения слизистой оболочки кишечника охватывают обширные участки.

Возбудитель нанофиетоза *N. schikhobalowi* впервые был обнаружен у человека К.И. Скрыбиным и В.П. Подъяпольской в 1928 году в низовьях Амура. Заболевание зарегистрировано в Приморском и Хабаровском краях (в долинах Уссури и ее притоков, в нижнем течении Амура) (Скрыбин, 1979). По данным Л.И. Синович (1974), специфическими симптомами нанофиетоза у 64% больных являются боли в животе, чаще колющего характера, до или после дефекации. Как правило, болевые ощущения локализуются в эпигастральной области или слева и выше пупка. У 61% больных отмечена диарея. При пальпаторном исследовании органов брюшной полости констатировано урчание слепой и сигмовидной кишок, у половины обследованных край печени был уплотненный и болезненный. Печень становится увеличенной и кровенаполненной. Иногда наблюдаются колющие боли в области сердца, а также приступы типа стенокардии. Кроме болевых ощущений пациенты жалуются на диспептические явления, снижение аппетита, отрыжку, тошноту, рвоту. При детальном исследовании у больных отмечается желтушность склер и слизистой оболочки неба, расширение границ сердца, гипотония (Мишаков, 1970).

Прошло около 50 лет со времен работ Н.Е. Мишакова 1965 – 1972 годов, посвященных детальному изучению распространения, патогенеза и лечения нанофиетоза в Пожарском (села по течению реки Бикин), Красноармейском, Тернейском и Ольгинском районах Приморского края (Мишаков, 1972б, в). Лечение им проводилось на базе больниц и фельдшерских пунктов по общепринятой в то время методике антигельминтными препаратами, экстрактом мужского папоротника, тимолом. В настоящее время празиквантел является эффективным в большинстве случаев лечения паразитарных инвазий. Клиническая и лабораторная диагностики основываются на эпидемиологическом анамнезе, проявлениях поражения кишечника и обнаружении яиц нанофиетусов в фекалиях. В 2009 – 2014 гг. А.Г. Драгомерецкая провела подобный сравнительный анализ зараженности популяций лососевых рыб и местного

населения Хабаровского края метацеркариями и маритами *N. schikhobalowi* соответственно (Драгомерецкая и др., 2012, 2014б; Драгомерецкая, 2015). Особенно высокие показатели зараженности были зарегистрированы в удэгейском селе Гвасюги, поскольку такие промежуточные хозяева нанофиетуса как ленок, хариус, таймень, кета и блюда национальной кухни из этих видов рыб (юкола, строганина, тала) являются основной частью рациона питания аборигенного населения (Драгомерецкая и др., 2014а).

В ряде штатов Тихоокеанского побережья США и в Канаде известны очаги нанофиетоза животных, вызываемого *N. salmincola*. Гельминт также служит «проводником» возбудителей тяжелых форм риккетсиозов животных (собак, лисиц, койотов). Чепин еще в 1926 г. высказал предположение о связи *N. salmincola* со смертельным заболеванием собак, возникающим после поедания лососей (Charin, 1926). Позднее это подтвердили, хотя было обнаружено, что внутриклеточные бактерии – симбионты *Neorickettsia helminthoeca*, а не сами трематоды были ответственны за заболевание (Headley et al, 2011; Vaughan et al., 2012). Таким образом, трематода является вектором для бактерий *N. helminthoeca*, вызывающих «болезнь отравления лососем» (SPD) и так называемый рыбий грипп (англ. fish flu) (Millemann, Knapp, 1970).

Паразиты *Nanophyetus* spp. входят в список СанПин (санитарных правил и норм) и, учитывая их патогенные свойства, важным является проведение профилактических мероприятий. При этом полезными будут знания о влиянии различных физических и химических факторов на выживаемость метацеркариев нанофиетуса. В работе Л.В. Филимоновой (1965) упоминается, что личинки паразита в мертвой рыбе при температуре 20 – 22°C сохраняли жизнеспособность в течение восьми дней, а при температуре 4°C они жили 15 – 16 дней. По данным Н.Е. Мишакова (1972), исследовавшего рыбу от рыболовецких бригад, отдельных граждан и общественных столовых, в кипящей воде личинки гибнут через 2 мин, в 10%-м солевом растворе живут до 7 сут, а в 20% – до 5 сут.

К профилактике нанофиетоза можно отнести отказ от употребления в пищу термически недостаточно обработанной или плохо просоленной рыбы,

выявление и лечение больных, защиту водоемов от фекального загрязнения, санитарно-просветительную работу (так как в целом существует низкий уровень знаний об опасности заражения гельминтами при употреблении сырой и малосоленой рыбы и о превентивных мерах). Однако, даже осведомленность жителей сел Хабаровского края об опасности заражения гельминтами при употреблении сырой и малосоленой рыбы не является причиной для отказа от этой привычки (Драгомерецкая и др., 2014а, б), поэтому заразиться гельминтами или нет, остается личным выбором каждого.

1.2. Использование маркеров ядерной ДНК для молекулярно-генетических исследований трематод

Несмотря на высокую практическую и научную значимость гельминты остаются малоизученной группой животных. Как модельные объекты, они характеризуются:

- Разнообразием жизнедеятельности;
- Нерешенными вопросами филогении и систематики;
- Коэволюционными взаимодействиями с видами-хозяевами;
- Доступностью биологического материала для генетических исследований.

Данные, касающиеся особенностей биологии, иммунологии, морфологии и биохимии ряда возбудителей, давая сложный спектр характеристик, часто недостаточны, а иногда усложняют таксономическую идентификацию исследуемых объектов. Для успешного изучения генетического разнообразия трематод при помощи молекулярных методов, прежде всего, необходимы исследования изменчивости отдельных нуклеотидных последовательностей и выбор тех, скорость эволюции которых удовлетворяет поставленным задачам (Larson, Wilson, 1989; Chai, 2009).

Рибосомная ДНК эукариот – сложно организованный локус, обычно состоящий из большого числа тандемно повторяющихся единиц (генных кластеров), разграниченных межгенными нетранскрибируемыми спейсерами

(IGS), содержащими энхансерные и регуляторные последовательности. В каждый кластер входит три гена: 18S, 5,8S и 28S, фланкированные внешними транскрибируемыми спейсерами (ETS) 5'-ETS и 3'-ETS (с 5'- и 3'-концов соответственно) и разделенные внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS1 и ITS2) (Noller, Woese, 1981; Brimacombe et al., 1983; Gutell et al., 1985, 1986; Ban et al., 2000; Demeshkina et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001; Gunnar, Odd, 2003; Taylor et al., 2009).

Присутствие рДНК в ядре в виде тандемных повторов делает ПЦР-амплификацию довольно эффективной, поэтому многочисленные исследования способствовали быстрому накоплению последовательностей генов рРНК в Genbank. Повторяющаяся природа рибосомных генов, наряду с активно работающей транскрипционной машиной и механизмами согласованной эволюции, приводит к тому, что внутривидовые отличия остаются незначительными, а между видами они аккумулируются. Именно поэтому гены рДНК являются предпочтительными маркерами для филогенетических исследований в самых разных таксономических группах (Dover, 1986; Беэр, Булат, 1998).

Систематика класса *Trematoda* имеет много пробелов, причиной чего является относительно небольшое (в сравнении, например, с позвоночными и членистоногими) количество признаков для традиционного морфологического анализа (Гинецинская, Добровольский, 1978; Littlewood, Olson, 2001; Шеховцов, 2010; Herrmann et al., 2014). Анализ 45 последовательностей 18S рДНК червей позволил Литтлвуду с соавторами уточнить монофилетичность происхождения *Neodermata* (*Trematoda*, *Monogenea* и *Cestoda*) (Littlewood et al., 1999). Авторы сообщают, что для исследования филогенетических взаимоотношений среди плоских червей, в дополнение к набору данных по морфологии, они выбрали последовательности генов 18S рРНК на том основании «что этот ген широко применяется во многих таксономических группах; регионы относительно высокой нуклеотидной изменчивости фланкированы участками с высокой степенью консервативности, что позволяет легко выравнивать нуклеотидные

последовательности и устанавливать базовую гомологию таксонов» (Littlewood et al., 1999).

Маркер 18S рДНК позволил успешно реконструировать филогенетические события в животном мире, начиная с кембрийского периода палеозойской эры (начало около 540 млн. л.н.) (Hwang, Kim, 1999). Ген 18S рРНК использовался при изучении разных типов червей (кольчатых, плоских, круглых) (Abouheif et al., 1998; Field et al., 1988; Zrzavy et al., 1998; Littlewood et al., 1999; Littlewood, Olson, 2001). В 2003 году Олсон, Ткач и Литтлвуд провели совместную работу по секвенированию большой и малой субъединиц рДНК. Состоялся глобальный пересмотр систематики Trematoda (Olson et al., 2001; Olson et al., 2003). В анализ были включены 163 таксона из 77 семейств широкого спектра хозяев и локалитетов, включая трематод, имеющих важное медицинское и экономическое значение (*Schistosoma*, *Fasciola* и *Paragonimus* spp.). Увеличение выборки таксонов и добавление 28S рРНК маркера (аналогично тому, как это было сделано для Cestoda и Monogenea) значительно улучшили ранее полученные филогенетические оценки, основанные только на 18S рРНК (Lockyer et al., 2003). Во всех анализах Digenea Carus, 1863 формировали две основные клады с сильной поддержкой узлов, объединяющие, согласно предложенной классификации, отряд диплостомид *Diplostomida nomen novum* и отряд плагиорхиид *Plagiorchiida* La Rue, 1957. Отряд *Diplostomida* включал единственный подотряд с тремя надсемействами, включая *Schistosomatoidea*. Авторы пришли к выводу, что более крупные трибы *Digenea* Carus, 1863 и существующие отряды *Echinostomida* La Rue, 1957, *Plagiorchiida* La Rue, 1957 и *Strigeida* Poche, 1926 отражают неестественные группировки таксонов (Olson et al., 2003). В новой классификации отряд *Plagiorchiida* в общей сложности включает 13 подотрядов и образует большое число независимых линий, ведущих к подотряду *Xiphidiata nom. nov.*, который включает надсемейства *Allocreadioidea*, *Gorgoderoidea* (в состав которого входит семейство *Troglotrematidae* с родом *Nanophyetus*), *Microphalloidea* и *Plagiorchioidea*, объединенные наличием проникающего стилета у церкариев. Используя результаты байесовского анализа данных, был определен состав видов

в признанных в настоящее время надсемействах и установлены новые виды. Систематика по Олсону с соавторами является общепринятой и используется в настоящей работе.

Последовательности ITS, по сравнению с генами 18S и 28S рРНК эукариот, характеризуются значительной изменчивостью (Long, Dawid, 1980; Hillis, Dixon, 1991; Gruendler et al., 1991; Lakshmikumaran, Negi, 1994; Britten, 1996; Osorio et al., 2005). Эта изменчивость ранее приводила к предположению, что ITS1 и ITS2 являются просто «мусорной ДНК», эволюция которой в результате накопления случайных мутаций была свободной от каких-либо функциональных ограничений (Coleman, 2003). Считается, что внутренние транскрибируемые спейсеры у трематод не очень вариабельны. Тем не менее, ряд исследований показал, что ITS содержат диагностические признаки, применимые для более глубокого анализа внутривидовой изменчивости (Morgan, Blair, 1995; Jousson et al., 1998; Hunter et al., 2007).

Спейсерные области рДНК ранее были использованы для определения видов 19-ти семейств трематод, в том числе, имеющих важное медицинское значение: Paragonimidae, Schistosomatidae, Diplostomidae, Strigeidae, Telorchiiidae. Нолан и Криб (Nolan, Cribb, 2005) посвятили обзор достижениям современной молекулярной биологии в систематике Digenea, описывая привнесенный в нее вклад маркеров ITS1 и ITS2. Они отмечают, что ITS1 более вариабелен на 5'-конце, и это позволяет использовать его для определения видов и их генетической изменчивости, в то время как консервативные последовательности на 3'-конце предоставляют информацию об их систематическом положении. Благодаря относительной простоте выравнивания, ITS2 используется чаще, чем ITS1. Показано, что у трематод изменчивость спейсеров относительно друг друга носит индивидуальный характер: в одних случаях более изменчив ITS1, а в других - ITS2 (Waikagul, Thaekham, 2014). У церкарий одного вида шистосом (*Trichobilharzia regenti*), вызывающих церкариоз людей («лихорадку купальщика»), было найдено два типа ITS1 (1100 и 1400 п.н.), различающихся по числу tandemных повторов (Picard, Jousson, 2001). Tandемные сателлитные

повторы, варьирующие по количеству среди особей одного вида, также обнаружены в ITS1 трематод из 5 родов: *Paragonimus*, *Schistosoma*, *Dolichosaccus*, *Echinostoma* и *Clonorchis*, и у цестод *Echinococcus* spp. (Hamburger et al., 1991; Van Herwerden et al., 1999; Tatonova et al., 2012). По данным филогенетического анализа, проведенного на основании сравнения последовательностей ITS1 *Crissicutis cichlasomae* (семейство Aporocreadiidae), как церкарий, так и взрослых особей, группа исследователей пришла к выводу, что *C. cichlasomae* представляет собой комплекс из семи криптических видов, для которых до сих пор не выявлены морфологические диагностические признаки. Эти наблюдения показывают, что некоторые традиционные морфологические признаки имеют существенные внутривидовые особенности и должны использоваться с осторожностью при классификации *C. cichlasomae* и их сестринских таксонов (Razo-Mendivil et al., 2010).

ITS2 маркер продемонстрировал свою неэффективность при изучении внутривидовой изменчивости выборок *Schistosoma japonicum* из семи провинций материкового Китая. Однако филогенетический анализ показал, что последовательности ITS2 успешно применимы для изучения межвидовых филогенетических отношений шистосоматид (Zhao et al., 2012). На основании сравнения конкатенированных последовательностей (ITS1+ITS2) и оценки генетической дифференциации (2,58%) между двумя синонимичными видами эхиностом, *Artyfechinostomum malayanum* и *Artyfechinostomum sufrartyfex*, группой авторов были получены результаты, в достаточной степени свидетельствующие о том, что ныне принятая синонимия этих видов недействительна (Tantrawatpan et al., 2012).

Из последних обзоров, где оцениваются показатели генетических расстояний, на основании данных маркеров ITS1 и ITS2 становится очевидной необходимость таксономической ревизии подотрядов Digenea, что открывает широкие перспективы дальнейшего использования генов рибосомного кластера (Choudhary et al., 2015).

1.3. Использование маркеров митохондриальной ДНК для молекулярно-генетических исследований трематод

Митохондриальная ДНК по сравнению с ядерной имеет ряд привлекательных особенностей: низкий молекулярный вес, компактную и консервативную организацию, материнский характер наследования, отсутствие рекомбинации (за редким исключением) и более высокую скорость эволюции – все это делает ее потенциально непревзойденным инструментом для генеалогического анализа популяционных выборок, реконструкции филогенетических связей и решения проблем систематики трематод (McManus, Bowles, 1996; Le et al., 2002; Vilas et al., 2005).

Последовательности митохондриальных генов оказались очень полезными для анализа внутривидовой изменчивости паразитических плоских червей, таких как *Fasciola hepatica* (Semyenova et al., 2006), *Opisthorchis felinus* (Катохин, 2008), *Paragonimus westermani* (Park et al., 2003), *Clonorchis sinensis* (Lee, Huh, 2004; Park, 2007; Tatonova et al., 2013; Chelomina et al., 2014) и *Echinococcus granulosus* (Bowles et al., 1992, 1994). У трематод из митохондриальных маркеров лучше всего изучены гены, кодирующие первые субъединицы NADH-дегидрогеназы (ND1) и цитохромоксидазы (COX1). Показано, что гены *cox1* и *nad1* являются хорошими маркерами для популяционно-генетического анализа *Schistosoma japonicum* (Bowles et al., 1993; Sorensen et al., 1998). Боулз с соавторами изучали степень генетической дифференциации гена *cox1* между изолятами *S. japonicum* из Китая и Филиппин (Bowles et al., 1993). Соренсен с соавторами получили показательные результаты, используя маркер *cox1*, для сравнения уровня генетической изменчивости популяций *S. japonicum* из 6 разных географических регионов в материковом Китае (Sorensen et al., 1998). Морган и Блэр показали эффективность генов *nad1* для идентификации видов и сравнения скоростей эволюции эхиностом (Morgan, Blair, 1998a). Гены *cox1* и *nad1* признаны высокоинформативными для исследования на межвидовом и внутривидовом уровнях, и таким образом, потенциально могут использоваться для изучения генетических различий родственных видов трематод (Semyenova et al., 2006; Pinto

et al., 2016; Nadler, Pérez-Ponce de León, 2011; Chelomina et al., 2014; Blasco-Costa et al., 2016). Полноразмерные последовательности митохондриальных генов успешно используются для филогенетического анализа при изучении процессов видообразования и эпидемиологических исследований. Это особенно важно, когда родственные виды кажутся фенотипически очень схожими, но различаются спектром хозяев или тяжестью эпидемиологических последствий (Bowles, McManus, 1994; Zarlenga, George, 1995).

Очаги трематодозов имеют тенденцию к смещению в силу изменяющихся климатических, гидрологических, фаунистических факторов. Таким образом, не исключается миграция паразитов вместе с их хозяевами и последующая гибридизация. Это хорошо было показано на примере двух видов парагонимусов – *Paragonimus bangkokensis* и *P. harinasutai* во Вьетнаме. При изучении взрослых червей, выделенных из легких кошки, экспериментально инфицированной метацеркариями, морфологически идентифицированными как *P. harinasutai*, было обнаружено, что одна из 6 особей имела кутикулярные шипы, что является особенностью *P. bangkokensis*. Последовательность гена *cox1* этого образца была идентична последовательности *cox1* *P. bangkokensis*, а нуклеотидные последовательности ядерного маркера ITS2 были идентичны *P. harinasutai*. Принимая все эти морфологические и молекулярные данные, ученые идентифицировали новую мариу как гибридный образец *P. bangkokensis* и *P. harinasutai* (Doanh et al., 2013).

Митохондриальные маркеры успешно применяются для филогеографических исследований трематод (McManus, Bowles, 1996; Le et al., 2002). Филогеография изучает исторические процессы, которые могут быть ответственны за современное географическое распространение видов и популяций. Термин филогеография был введен Авайсом с соав. в 1987 году для описания пространственного распределения генеалогических родословных (Avisé, 2000). Современные мультигенные филогенетические исследования (включающие построение медианных сетей, анализ нуклеотидного разнообразия в пределах гаплогрупп, сопоставление популяций по гаплотипическому составу)

предоставляют большие возможности для соотнесения филогенетической истории таксонов с палеографической историей и реальной временной шкалой. Развитием этих направлений обуславливается возникновение большого числа гипотез, описывающих общие закономерности формирования флоры и фауны определенной территории, сукцессий, а также отражающих влияние на эти процессы различных факторов (таких как климатические изменения, тектонические процессы, орогенез, денудация и т.д.). Связывая микро- (этология, демография и популяционная генетика) и макро- (историческая география, палеонтология и филогенетика) эволюционные подходы, филогеография внесла значительный вклад в сохранение и описание новых видов, экологию и эволюционную биологию (Абрамсон, 2007).

С использованием митохондриального маркера *cox1* изучена филогеография печеночных сосальщиков – описторхид (*O. felineus*, *C. sinensis*) и кровяных сосальщиков – шистосом (*Trichobilharzia*: *T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti* и *Bilharziella polonica*) (Шеховцов и др., 2008; Лопаткин и др., 2010; Хрисанфова и др., 2011; Брусенцов и др., 2013; Chelomina et al., 2014). Известно, что в плейстоцене северная часть Евразии неоднократно претерпевала оледенения. Примерно 15 – 22 тыс. лет назад на этих территориях был отмечен последний ледниковый максимум, после которого началось потепление климата и активное таяние ледникового щита, что создало благоприятные условия для расселения хозяев паразита и вслед за ними выжившей популяции *O. felineus* на всю территорию Восточной Азии, Сибири и Восточной Европы. Предположительно, местом рефугиума *O. felineus* являются реликтовые водоемы Средней Азии (Брусенцов и др, 2013). Экспансия *C. sinensis* на северной части ареала началась 60 – 100 тыс. лет назад. Наличие географических барьеров между отдельными регионами Восточной Азии внесло свой вклад в формирование четырех генетически однородных групп, выделенных Брусенцовым с соавт. и расположенных на территории Ю. Кореи, Северного и Северо-Восточного Китая и Дальнего Востока России. Маньчжуро-Корейские горы долгое время были покрыты ледниками, что могло привести к формированию на Корейском

полуострове обособленной генетической группы вследствие ее изоляции. Малый Хинган препятствовал проникновению на Дальний Восток диких животных с территории Китая, поэтому исследователи считают, что распространение клонорхиса в Приморье было следствием активной миграции племен человека, начавшейся около 6,5 тысяч лет назад. Появление клонорхиса на Японских островах из разных регионов также носит антропогенный характер (Брусенцов и др., 2013). Челоминой с соавторами (Chelomina et al., 2014) впервые было изучено генетическое разнообразие географически изолированных популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама на основании сравнения полных последовательностей гена *cox1*. Авторы отмечают, что уже имеющиеся данные по клонорхису основаны главным образом на неполных последовательностях генов, что может приводить к ошибочной интерпретации эволюционной истории вида. В частности, новые данные не подтвердили наличие бутылочного горлышка в популяции *C. sinensis* в недавнем прошлом. Полученные результаты предполагают глубокую локальную адаптацию паразита к среде обитания, включая промежуточных хозяев, и существование потока генов между географически отдаленными популяциями. Время демографического роста популяции *C. sinensis* датируется поздним плейстоценом, после последнего ледникового максимума (23 – 15 тыс. лет назад), причем основным плейстоценовым рефугиумом для клонорхиса вероятнее всего был Юго-Восточный Китай (Chelomina et al., 2014).

Среди трематод одну из древних и высокоспециализированных групп представляют кровяные сосальщики птиц и млекопитающих из семейства Schistosomatidae (Безр, Воронин, 2011). В 2007 году были получены полные последовательности белок-кодирующих генов митохондриального генома шистосом млекопитающих из рода *Schistosoma* (Zarowiecki et al., 2007). Различные виды и штаммы шистосом подробно изучены с помощью митохондриальных маркеров, что позволило подтвердить выделение внутри рода четырех основных морфо-экологических групп, а также выявить ряд новых закономерностей в распространении и происхождении латиноамериканских и афро-азиатских видов и популяций (Stothard, Rollinson, 1996; Lockyer et al., 2003).

Хрисанфовой с соавторами была продемонстрирована внутривидовая изменчивость митохондриального гена *cox1* четырех видов шистосом родов *Trichobilharzia* и *Bilharziella* из Республики Беларусь, и впервые выдвинуто предложение использовать этот ген для «баркодинга» популяций птичьих шистосом (Хрисанфова и др., 2009). Несколько позднее была изучена филогеографическая структура церкариальных изолятов *Bilharziella polonica* птиц из трех озер и показана дифференциация на две генеалогические линии внутри *B. polonica*, с возможным временем расхождения примерно 180 – 270 тыс. лет назад (Хрисанфова и др., 2011). Гаплотипическое разнообразие церкариальных изолятов шистосом из рода *Trichobilharzia*: *T. szidati*, *T. franki* и *T. regenti*, выделенных из птиц водоемов Московской области, оказалось также высоким, и свидетельствовало о генетической уникальности практически каждой из последовательностей гена *cox1* в выборке. На основании данного маркера исследователями было выделено две группы изолятов с разной хозяиноспецифичностью и показано, что расхождение между изученными видами птичьих шистосом и дивергенция азиатских видов шистосом млекопитающих могли происходить примерно в одно и то же время – 2,5 – 3,8 млн. лет назад (Лопаткин и др., 2010).

В ряде работ использованы последовательности гена *cox1* для демонстрации межвидовых отличий птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* на территории Северной Америки (Brant, Loker, 2009). Высокие уровни генетического разнообразия обнаружены для последовательностей гена *cox1* *Schistosoma turkestanicum* из Венгрии (Lawton et al., 2017). Анализ частот гаплотипов показал, что каждый хозяин содержал собственную субпопуляцию генетически уникальных паразитов. Биохимическое моделирование выявило мутации, вызвавшие изменение изоэлектрической точки COX1, что потенциально может влиять на обмен веществ (Lawton et al., 2017). Эволюционный сценарий, основанный на маркере *cox1*, указывает на местную адаптацию и длительное существование *S. turkestanicum* в Венгрии с непрерывной интрогрессией ядерных генов из азиатских изолятов (Lawton et al., 2017).

В последние годы многочисленные группы исследователей проводят секвенирование митохондриальных геномов с целью комплексного анализа филогении, изучения внутри- и межвидовой генетической изменчивости, трематод, в особенности патогенных для людей и животных. Это работы из области NGS (англ. next-generation sequencing) или выполненные традиционным методом секвенирования по Сэнгеру. Определены последовательности митохондриальных геномов более 30 видов сосальщиков (Na et al., 2016), включая такие эпидемиологически значимые виды, как *Haplorchis taichui* (15130 п.н.), *Opisthorchis felinus* (14277 п.н.), *Clonorchis sinensis* (13875 п.н.), *Fascioloides magna* (14047 п.н.), *Paragonimus westermani* (15004 п.н.) (Le et al., 2002; Shekhovtsov et al., 2010; Lee et al., 2013; Biswal et al., 2014; Ma et al., 2016). Полноразмерные митохондриальные геномы позволяют успешно аннотировать гены, кодирующие тРНК, белок-кодирующие гены и предоставляют широкие возможности для разработки новых маркеров для популяционных и биогеографических исследований. Было показано, что митохондриальный геном *H. taichui* (сем. Heterophyidae) имеет много общих черт с видами Opisthorchiidae, в отличие от других групп трематод, что подтверждали и филогенетические анализы с максимальной поддержкой (Lee et al., 2013). Однако вместе с тем, на основании сравнения объединенных последовательностей белок-кодирующих генов мтДНК, образцы индийских изолятов *P. westermani* (семейство Paragonimidae) на филогенетическом древе оказались в семействе Opisthorchiidae (Biswal et al., 2014). Определение последовательности митохондриального генома *F. magna* обеспечивает перспективы для дальнейших исследований филогении семейства Fasciolidae и для разработки соответствующих молекулярных маркеров. Будущее действительно за секвенированием полноразмерных последовательностей мтДНК: в значительной степени для сравнительного анализа митохондриальных геномов трематод, для молекулярно-эпидемиологических исследований гельминтозов и молекулярной диагностики.

1.4. Пространственная организация биомолекул

Консервативные и переменные области рДНК применяются не только для реконструкции филогенетических связей организмов (Woese et al., 1980, 1990; Friedrich, Tautz, 1997 а, б), но и для понимания особенностей функционирования кодирующих и некодирующих структурных последовательностей внутри кластера генов рРНК (Noller, 2005). Рибосомные РНК вместе с рибосомными белками (англ. RPs – ribosomal proteins) участвуют в важнейших этапах синтеза белка и являются ядром протеосинтетического ферментативного комплекса (Tafforeau et al., 2001). После того как стали известны все рибосомные белки и РНК, входящие в состав малой и большой субъединиц (примерно с 1990 годов), стали появляться попытки с помощью криоэлектронной микроскопии реконструировать вторичные и третичные модели рибосом (3D) (Рисунок 2). Оказалось, что вторичные структуры рРНК представлены многочисленными двухспиральными участками («шпильками»), образующимися в результате комплементарного спаривания оснований (А с U и G с C) одной и той же цепи; шпильки соединены между собой короткими одотяжевыми участками. Тело шпильки называют стеблем, а конец – петлей (Рисунок 3).

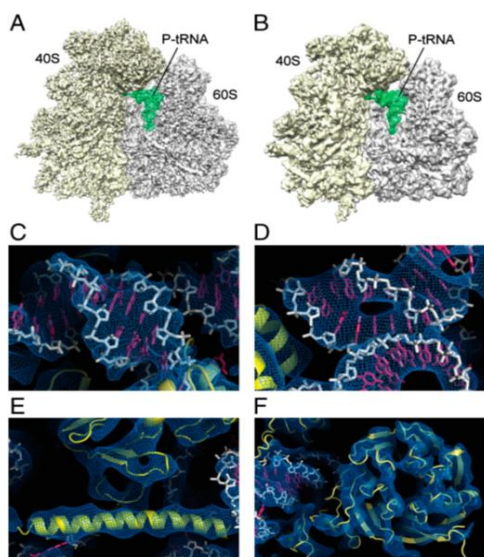


Рисунок 2. Cryo-EM реконструкция 80S рибосом (40S и 60S желтого и серого цветов, соответственно, тРНК – выделена зеленым). А – *Triticum aestivum*; В – *Saccharomyces cerevisiae*; С–F – 80S *T. aestivum* в разных проекциях. Рибосомные белки – желтый, основной скелет рРНК – белый, нуклеотиды – красные (по: Armache et al., 2010).

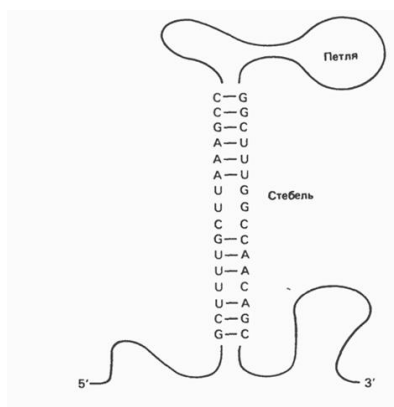


Рисунок 3. Вторичная структура молекулы РНК типа «петля со стеблем» («шпилька»), возникающая вследствие внутримолекулярного образования водородных связей между комплементарными парами нуклеотидных оснований (по: Марри и др., 1993).

Эволюция часто сохраняет функциональную структуру РНК лучше, чем ее первичную последовательность (Hofacker et al., 2002). Поэтому в последнее время анализ первичных последовательностей рДНК дополняется реконструкциями вторичных структур их транскриптов (Woese et al., 1980; Noller, Woese, 1981;

Brimacombe et al., 1983; Gutell et al., 1985, 1986; Ban et al., 2000; Demeshkina et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Yusupov et al., 2001; Gunnar, Odd, 2003; Taylor et al., 2009; Armache et al., 2010). В тех случаях, когда высоко дивергированные участки последовательностей ДНК не удается выровнять с использованием стандартных алгоритмов, информация об истинном расположении спорных нуклеотидов также может быть получена из анализа их вторичных структур (Gutell, Fox, 1988; Gutell et al., 1992, Gutell, 1993; Gerbi, 1996; Taylor et al., 2009; Armache et al., 2010; Zhang et al., 2010). Решая вопросы систематики, одновременно можно проследить, как развивается и эволюционирует вторичная структура рРНК (Zrzavy et al., 1998; Cannone et al., 2002; Schwalie, Petra, 2012; Tafforeau et al., 2013). Сохранение в ходе эволюции двух довольно удаленных друг от друга нуклеотидов указывает на наличие структурно необходимой водородной связи между ними. Вторичная структура небольших молекул РНК в значительной степени определяется сильными локальными взаимодействиями, такими как водородные связи и стэкинг-взаимодействия пар оснований. Сумма значений свободной энергии таких взаимодействий должна обеспечивать стабильность данной структуры. РНК легко образует сложные вторичные и третичные структуры, отчасти потому, что дополнительный атом кислорода в составе рибозы увеличивает склонность к образованию водородной связи основной цепью нуклеиновой кислоты (Shen et al., 1995; McGinnis et al., 2009). В трехмерной структуре спирали (стебли) и неспаренные участки (свободные концы и петли) располагаются друг относительно друга в строго определенном порядке, и образуются так называемые третичные взаимодействия. Третичная структура – это уровень организации, ответственный за биологическую функцию РНК (Taylor, 2009).

Вторичная структура рРНК может быть определена различными способами, сочетающими в себе сильные стороны эмпирических и экспериментальных методов (Reuter, Mathews, 2010; Edger et al., 2014). Первые делятся на две категории: одни используют множественные выравнивания, другие предсказывают структуру исходя из одной последовательности, используя минимизацию свободной энергии. Точность фолдинга обычно выше у методов,

использующих множественные выравнивания, а достоверность результатов достигается за счет исследования большего количества последовательностей разных видов. Метод, предложенный в 1981 году М. Цукером и П. Стейглером, предполагает, что правильная структура в равновесии обладает наименьшей свободной энергией (DG) (Zuker, Stiegler, 1981; Zuker, Sankoff, 1984). DG вторичной структуры РНК оценивается как сумма свободных энергий петель, пар оснований и других элементов вторичной структуры. Динамическое программирование позволяет проверить все возможные варианты вторичных структур РНК без непосредственного их создания. Алгоритм работает рекурсивно. Наилучшая структура с минимальной возможной энергией рассчитывается вначале для всех возможных коротких подпоследовательностей, а затем для все более длинных подпоследовательностей. Точное строение молекулы РНК определяется вычислением минимальной свободной энергии полной последовательности (Mathews, 2006), включая Уотсон-Криковские и альтернативные Хугстиновские пары (Hoogsteen, 1963; Nikolova et al., 2011). Алгоритмы динамического программирования обычно используются, чтобы обнаружить «хорошо вложенные» конфигурации пар оснований, то есть те, которые образуют водородные связи, не перекрывающиеся с другими участками последовательности. К таким структурам относятся двойные спирали, стеблевые петли и варианты «клеверного листа», встречающиеся, например, в транспортной РНК (Рисунок 4) (Lorenz et al., 2017).

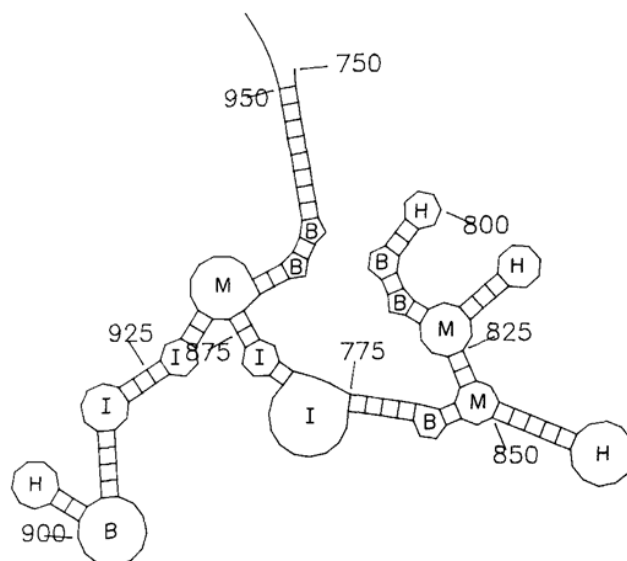


Рисунок 4. Общий вид структуры гипотетической молекулы рРНК. В – выпуклые петли, I – внутренние петли, Н – шпильки, М – множественные петли (по: Zuker, Sankoff, 1984).

В термодинамическом методе сложность проблемы предсказания вторичной структуры может быть продемонстрирована количеством возможных моделей фолдинга. В целом, точность предсказания вторичной структуры единичной молекулы РНК путем минимизации свободной энергии ограничивается следующими факторами: 1 – не все известные укладки РНК соответствуют термодинамическому минимуму; 2 – некоторые последовательности РНК имеют более одной биологически активной конформации (по типу рибопереключателей) (Serganov, Nudler, 2013). По этой причине способ предсказания вторичных структур с похожим низким значением свободной энергии может дать существенную информацию. Такие структуры называются субоптимальными. MFOLD – одна из программ, генерирующая субоптимальные структуры (Zuker, 2003).

18S рРНК образует коровую структуру малой рибосомной субъединицы и играет важную роль в обеспечении нормального протекания процессов рибогенеза, регуляции транскрипции и трансляции, переноса белков через мембраны (Rungger et al., 1979; Sollner, Tower, 1986; Gillespie et al., 2006; Taylor et

al., 2009; Armache et al., 2010). Проанализированы структуры 18S рРНК представителей доменов Archaea (Mears et al., 2002), Bacteria (Mears et al., 2002), Eucarya (De Rijk et al., 1992; Doudna, Rath, 2002; Armache et al., 2010; Gillespie et al., 2006; Taylor et al., 2009; Demeshkina, et al., 2012).

Несмотря на единый план строения вторичных структур, внутри 18S рРНК были выявлены участки разной степени консервативности. Малоизменчивые последовательности формируют каталитическое ядро, необходимое для функционирования рибосомы («minimal ribosome»). Их пространственная организация, включая h6, h7, h8, h10 – h16, h24, h27, h34 – h38 и т. д., практически идентична у всех исследованных на сегодняшний день организмов (Armache et al., 2010; Demeshkina, et al., 2012), а мутации в таких областях могут быть летальны. Доказано, что нарушения в консервативной спирали 27 у дрожжей приводят к изменениям на сайте декодирования и прекращению синтетических процессов (Velichutina et al., 2000). Однако в каталитическом ядре могут встречаться вставки или делеции, свидетельствующие о том, что конформация рибосом претерпевала некоторые изменения в процессе эволюционной адаптации (Cannone et al., 2002; Maule et al., 2006; Mallatt et al., 2010). Области взаимодействия двух рибосомных субъединиц на h44 (межсубъединичный мост между рибосомными протеинами rpS17e (40S) и rpS24e (60S)) относят к областям с низкой степенью изменчивости. Интересным является тот факт, что нуклеотидные последовательности ES12^S, соединенные с h44 у разных видов животных, относительно изменчивы, но с сохранением формы укладки вторичных структур (Maule et al., 2006; Voss et al., 2006; Armache et al., 2010; Mallatt et al., 2010; Wilson, Cate, 2012). Основная изменчивость 18S рРНК сосредоточена в вариабельных доменах, так называемых expansion segments – ES, перемежающихся с консервативными у большинства эукариот последовательностями гена (Gerbi, 1996; De Rijk et al., 1992). В третичной конформации молекулы эти участки располагаются по периферии, окружая область взаимодействия мРНК с тРНК, не задевая каталитического ядра (Mears et al., 2002; Wilson, Cate, 2012). Большинство авторов объясняют эту особенность эволюционной древностью формирования белоксинтезирующего

аппарата эукариот (Hofacker, 2003; Lee, Gutell, 2004). Рибосомы архей, бактерий и эукариот различаются по размеру, и вероятно из-за того, что организмы населяют широкие диапазоны различных сред, у них выработались свои рибосомные модификации для гарантированной эффективности трансляции (Cortadas, Pavon, 1982). Часто при моделировании вторичных структур транскриптов 18S рДНК исследователи пересматривают границы ES, особенно при включении в анализ рибосом млекопитающих (Chandramouli et al., 2008). Много моделей вторичных структур 18S рРНК известно для насекомых. Характерные черты пространственной организации 18S рРНК для типа членистоногих удается проследить при сравнении фолдинга консервативных и варибельных участков разных представителей: Arachnida – *Aphonopelma sp*; Coleoptera – *Tenebrio molitor*; Hemiptera – *Acyrtosiphon pisum*; Diptera – *Drosophila melanogaster* (Gillespie et al., 2006; Zhao et al., 2013). Работ по моделированию вторичных структур этих участков, как и молекулы в целом, для трематод нет. Среди паразитических червей подобные исследования проводились только на моногенеях и цестодах (Matejusova 2004; Zhang et al., 2010, 2017).

Экспериментальные данные последних лет убедительно свидетельствуют в пользу функциональной значимости спейсерных последовательностей рДНК. Можно предположить, что структура ETS (внешних транскрибируемых спейсеров) влияет на интенсивность синтеза рРНК с промотора, локализованного рядом с этой спейсерной последовательностью (Hofacker et al., 1994; Capriotti, Marti-Renom, 2008). Установлено, что вторичная структура внутренних спейсеров (ITS1, ITS2) важна для правильного созревания первичных транскриптов рРНК (Hunter et al., 2007). Вторичные структуры ITS известны для многочисленных видов прокариот, инфузорий (Chao-Yang, Shou-Yu, 2009), одноклеточных грибов (van Nues et al., 1995), диатомовых водорослей (Hunter et al., 2007), высших растений (Trendelenburg et al., 1974; Mai, Coleman, 1996) и животных (Harris, Crandall, 2000; Gillespie et al., 2006; Dorado, Sánchez, 2008; Hribova et al, 2011). Более того, вторичные структуры ITS2, наряду с первичными последовательностями, успешно используются для установления родства разных

таксонов (Littlewood et al., 1999; Littlewood, Olson, 2001; Koetschan et al., 2010) (Рисунок 5).

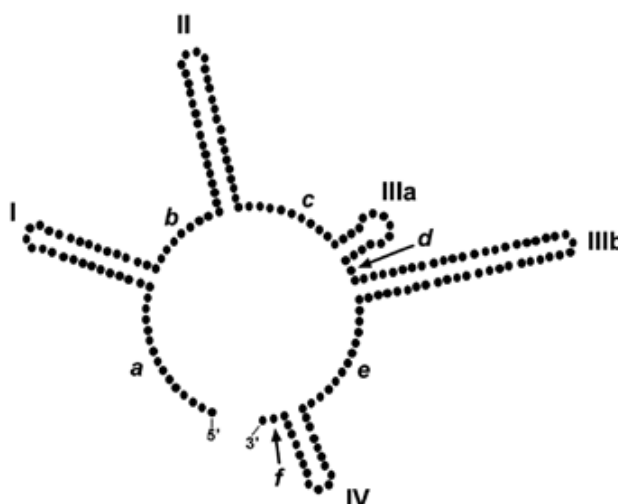


Рисунок 5. Схематичное изображение вторичной структуры ITS2 на примере динофлагелляты рода *Symbiodinium*. Малые строчные буквы (a – f) означают одноцепочечные участки в пределах структуры, (I – IV) – спирали (по: Hunter et al., 2007).

В то время как последовательности ITS2 эукариот являются переменными, вторичные структуры, которые они формируют, остаются сравнительно консервативными (Hunter et al., 2007; Morgan, Blair, 1995; Morgan, Blair, 1998б). Они имеют вид ладони с четырьмя пальцами (palm with four fingers), т.е. одно центральное звено и четыре ветвящихся домена-спирали с разной степенью изменчивости (Рисунок 5). Правильная укладка ITS2 является необходимым условием для точного и эффективного процессинга пре-рРНК. Ряд работ посвящен вторичным структурам ITS2 трематод (описторхисов, клонорхисов, парагонимусов, эхиностомид, фасциолид) (Morgan, Blair, 1998б; Prasad et al., 2009; Ghatani et al., 2012; Tatonova et al., 2012). Исследования по вторичным структурам ITS1 немногочисленны. Известно, что этот спейсер больше соответствует ITS бактерий и архей, в то время как ITS2 возник как вставка, прерывающая пре-28S рРНК. ITS1 слишком переменен, поэтому оптимальную генерализованную вторичную структуру сложно смоделировать (Michot et al., 1993; Hofacker et al., 1994; Capriotti, Marti-Renom, 2008; Lotfy et al., 2010; Ghatani et al., 2012; Tatonova et al., 2012). Тем не менее, ряду исследователей это удалось, полученные ими

структуры имеют вид ветвящихся стеблей, несущих регуляторные мотивы (Tatonova et al., 2012; Rampersad, 2014).

Проблемы выравнивания и предсказания консенсусной структуры тесно связаны. Некоторые моделируемые структуры (например, ITS2) были консенсусными. Данный подход заключается в построении множественного выравнивания последовательностей РНК, нахождении консенсусной последовательности, а затем ее укладке. Качество выравнивания определяет точность консенсусной структурной модели. Консенсусная последовательность укладывается с использованием различных подходов, наподобие тех, что были описаны выше для предсказания вторичной структуры индивидуальных молекул РНК. Например, подход, использующий термодинамическую укладку, представлен в программе RNAalifold (Hofacker et al., 2002).

Чтобы понять основные принципы моделирования трехмерных структур белковых молекул и потенциал их использования в различных областях исследований, от академических до промышленных, фармацевтических и биотехнологических, следует вкратце рассмотреть четыре уровня организации белка. Различные структурные уровни зависят друг от друга, вместе создавая чрезвычайно сложную сеть взаимодействий между сотнями и тысячами атомов. Первым уровнем является аминокислотная последовательность. Насчитывается 20 различных аминокислот, наиболее часто встречающихся в белках. Последовательность этих аминокислот в полипептидной цепи существенно определяет типы присутствующих элементов вторичной структуры (второй уровень организации) и способ их размещения в пространстве, создавая структурные мотивы (спирали) и складки (третий уровень организации). Независимая единица фолдинга трехмерной структуры белка называется доменом. Домены часто могут быть клонированы, экспрессированы, очищены независимо от остальной части белка, и они могут даже проявлять самостоятельную активность. Некоторые белки содержат один домен, в то время как другие могут содержать несколько. Домены имеют определенный тип фолдинга. Домены с одинаковым фолдингом могут или не могут быть связаны

друг с другом функционально, потому что в природе неоднократно используются одни и те же типы сборки (Kelley et al., 2015). Существующие в настоящее время белковые трехмерные структуры в Белковом Банке Данных (англ. Protein Data Bank) были классифицированы на более чем 1000 различных уникальных моделей (Berman et al., 2000).

Четвертый уровень – четвертичная структура. Четвертичная структура состоит из нескольких полипептидных цепей (субъединиц) гомоолигомеров или гетероолигомеров. Субъединицы внутри таких структур взаимодействуют друг с другом, могут способствовать появлению активного сайта (сайтов), вносить вклад в динамику комплекса и взаимодействовать с некоторыми белками-мишенями (Wass et al., 2010). Четвертичную структуру можно проиллюстрировать на примере магниевой хелатазы. Структура была получена с использованием реконструкции на основе криоэлектронных микроскопических (криоэмульсионных) изображений и рентгеновских 3D-структур субъединиц фермента. Все четвертичные структуры аналогично моделируются на основе известных трехмерных структур белков (Kelley et al., 2015).

Как и в случае с рРНК, значительные вариации в аминокислотных последовательностях могут в конечном итоге приводить к сборке одной и той же структуры, т.е. структура имеет более высокую степень консервативности, чем первичные последовательности ее образующие. Интересный пример демонстрирует кобальт-хелатаза (CobN) прокариот – фермент, ответственный за синтез витамина B12. Несмотря на то, что функция белка была известна (Schubert et al., 1999), его сходство с ферментом феррохелатазой (гемсинтазой) было показано только после определения трехмерной структуры (Al-Karadaghi et al., 1997). Причина в том, что существует только 11% идентичности первичных последовательностей между этими белками, и это число намного меньше, чем так называемый «порог гомологии» (англ. «homology-threshold»), обычно учитываемый при выравнивании как показатель эволюционных отношений (около 20 – 25%). Так было показано, что определение трехмерной структуры белковой молекулы часто помогает выявить ее функцию.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение паразитологического материала

Материалом для исследования послужили выборки *Nanophyetus* spp. трех региональных популяций: российского Дальнего Востока, Японских островов и Северной Америки, представленных *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно (Рисунок 6А; Таблица 1). Образцы *Nanophyetus schikhobalowi* были получены из четырех локалитетов; точки сбора в Приморском крае находились на западе – Ханкайский район, реки Комиссаровка и Илистая; на юге – Уссурийский районный округ, река Комаровка; и в центральной части – Чугуевский район, река Павловка (Рисунок 6Б). Образцы *N. japonensis* были выделены из рыб, пойманных в горном ручье (Shirabuzawa at Iritazawa) Японии (префектура Ямагата). Экземпляры *N. salmincola* получены В.В. Ткачем из лососевых рыб в штате Орегон (США). Взрослых особей трематод (мариты) *N. schikhobalowi* получали экспериментальным путем в лаборатории ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН. Часть образцов *N. schikhobalowi* была любезно предоставлена В.В. Беспрозванных, метацеркарии и мариты *N. japonensis* – Я. Араки (Yasuo Araki), Х. Кино (Hideto Kino) и Т. Шимадзу (Takeshi Shimazu).

Выловленных дальневосточных лососевых (*Brachymystax lenok* Pallas, 1773) и карповых (*Phoxinus oxycephalus* Sauvage, Dabry de Thiersant, 1874) рыб проверяли на зараженность (жабры, почки и мышцы плавников), затем метацеркарий вместе с мышечным волокном скармливали лабораторным крысам (*Rattus norvegicus*) и сирийским хомячкам (*Mesocricetus auratus*), а по истечению 24 суток животных умерщвляли и извлекали марит из тонкого кишечника. Метацеркарии *N. japonensis* были выделены из японского лосося *Salvelinus leucomaenis pluvius* Hilgendorf, 1876 (Hideto Kino). Хомячков (*M. auratus*) инфицировали по описанной выше методике. Метацеркарий и взрослых червей, предварительно отмытых в физиологическом растворе, фиксировали в 96% и в 70% этаноле для последующих молекулярных и морфологических исследований соответственно. Образцы хранили при температуре +4°C. Виды

идентифицировали д.б.н. В.В. Беспрозванных, профессор Т. Шимадзу и В.В. Ткач. Все экспериментальные работы с животными осуществляли в соответствии с Правилами по использованию в опытах позвоночных животных, утвержденных Президиумом ДВО РАН.

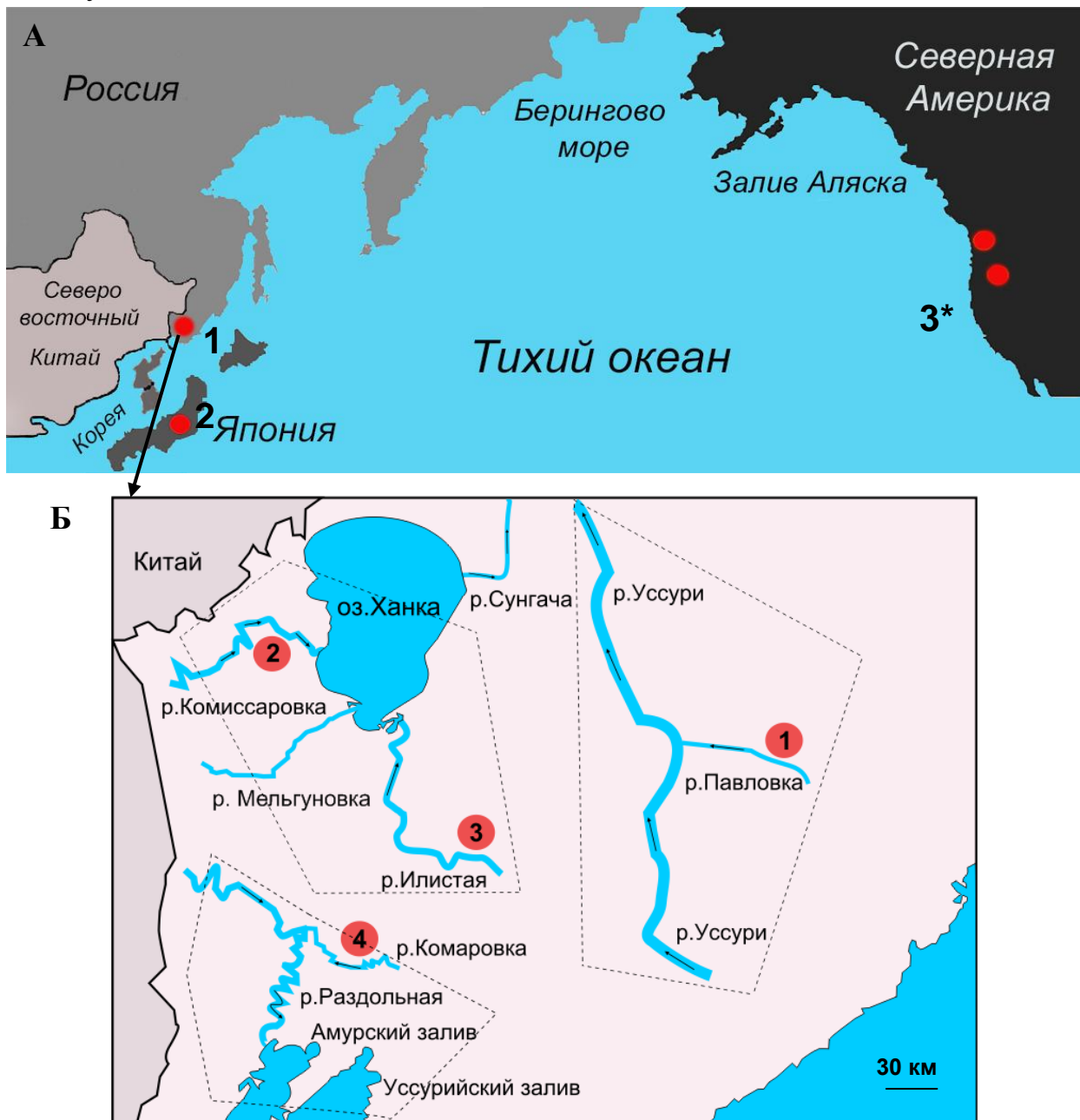


Рисунок 6. Локализация исследованных выборок *Nanophyetus* spp.: Российский Дальний Восток – 1, Япония – префектура Ямагата (остров Хонсю) – 2, Соединенные Штаты Америки, Орегон и Вашингтон – 3 (А); Места сбора на Дальнем Востоке: река Павловка (Чугуевский район) – 1, реки Комиссаровка – 2 и Илистая – 3 (Ханкайский район), река Комаровка – 4 (Уссурийский район) (Б). Выборки маркированы красными кружками. * обозначены последовательности взятые из GenBank. Пунктирными линиями указаны водоразделы рек.

Таблица 1. Список паразитологического материала

Виды	Количество особей	Регион, (страна)	Место сбора, река (бассейн)	Промежуточный хозяин
<i>N. schikhobalowi</i>	57	Дальний Восток (Россия)	1 - Павловка (р. Амур) 2 - р. Комиссаровка (оз. Ханка) 3 - р. Илистая (оз. Ханка) 4 - р. Комаровка (р. Раздольная)	<i>B. lenok</i> <i>P. oxycerphalus</i>
<i>N. japonensis</i>	16	Японские острова, префектура Ямагата (Япония)	5 - Ширабузава	<i>S. leucomaenis pluvius</i>
<i>N. salmincola</i>	4	Северная Америка, штат Орегон (США)	6 - Уилламетт	<i>O. kisutch</i>

2.2. Выделение геномной ДНК

ДНК паразитов, как метацеркарий, так и половозрелых особей, выделяли методом щелочного лизиса (Hot Sodium Hydroxide and Tris – HotSHOT) (Truett et al., 2000). Образцы, предварительно отмытые от спирта в 10 мкл буфера для щелочного лизиса HotSHOT-1 (25 мМ NaOH и 0,2 мМ EDTA, pH=12), инкубировали в том же растворе в течение 30 мин при 96°C. После чего образцы охлаждали до 10°C в течение 10 минут и добавляли нейтрализующий буфер HotSHOT-2 (40мМ Tris-HCl, pH=5). Полученный раствор ДНК хранили при температуре -20°C.

2.3. Амплификация ДНК

Для амплификации полноразмерных 18S и 28S генов рибосомного кластера *Nanophyetus* spp., ITS1-5,8S-ITS2 региона ядерной рибосомной ДНК, а также частичных и полных последовательностей гена *nad1* мтДНК были использованы специально разработанные и универсальные для большинства трематод праймеры (Таблица 2).

Таблица 2. Список праймеров для амплификации ДНК

Праймеры	Последовательность (5' – 3')	Ориентация	Ссылка
Ген 18S рРНК			
18S-E	CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGAT CCTGCCAGT	Прямые	Littlewood, Olson, 2001
18S-8	GGTGCCAGCMGCCGCGGT		
18S-2/1200F	ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA		
892c	GTCAGAGGTGAAATTCTTGG		Krieger et al., 2006
1/F	CACACCGCCCGTCG		
Ael-3	GTATCTGATCGTCTTCGGC	Обратные	Littlewood, Olson, 2001
18S-11/1262R	AACGGCCATGCACCACCACCC		
18S-A27	CCATACAAATGCCCCCGTCTG		
18S-4/1400R	AGCGACGGGCGGTGTGTAC		
18S-F	CCAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTTAC CTAC		
ITS (ITS1+5,8S+ITS2)			
1/F	CACACCGCCCGTCG	Прямые	Krieger et al., 2006
BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA		Luton et al., 1992
3S	GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG		Prasad et al., 2007
TS700	CTCAGTCTAGCCCAGGATA	Обратные	Voronova, Chelomina, 2018
NJTS2_1149R	CCACAAAGGCACAAGA		Luton et al., 1992
BD2	TATGCTTAAATTCAGCGGGT		
Dig1L	GTGATATGCTTAAGTTCAGC		Tkach et al., 2000
Ген 28S рРНК			
DigL2	AAGCATATCACTAAGCGG	Прямые	Tkach et al., 1999
U178	GCACCCGCTGAAYTAAAG		Lockyer et al., 2003
U1148	GACCCGAAAGATGGTGAA		
1600F	AGCAGGACGGTGGCCATGGAAG		
U1846	AGGCCGAAGTGGAGAAGG		
U3139	AAGTTACCACAGGGATAACTGGCT		
1500R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Обратные	Olson et al., 2003
L1642	CCAGCGCCATCCATTTTCA		Lockyer et al., 2003
L2230	AGACCTGCTGCGGATATGGGT		
L2450	GCTTTGTTTTAATTAGACAGTCGGA		
L3449	ATTCTGACTTAGAGGCGTTCA		
LSU3-4160	GGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCC		
Ген <i>nadI</i> мтДНК			
MB352	CGTAAGGGKCCСТААУААG	Прямой	Criscione, Blouin, 2004
MB399	CTTACAAAATAGTCATAGCG	Обратный	

Таблица (Продолжение)

nds-new2	AGAGGTTTATTACAAAGGTT	Прямой	Voronova, Chelomina, 2018
nds-newr	GCTAATGAAACCAATAACAСТ	Обратный	
nd3f	GATGTGTGCTCTGCG	Прямые	(разработанные в настоящей работе)
nd1f1	AAGGGTCCTAATAAGGTGGG		
nd1f+	AATATTTTGGGGTGGTTGGAG		
nd3f2	AGCGTTCGGTGGAGGTT		
nd3rev3	CTTAACCCACCTTATTAGG	Обратные	
nd1r2in	CTCACCAAAGCAAACCTTATT		
nd1nanr	GAACCAAACGCAGATCGAAT		
nd1r+	ACCGGAGTAAGAATCCGAA		
nd3r2	TCTTAACCCACCTTATTAGGACC		

Реакционная смесь для стандартной ПЦР (20 мкл) генов 18S и 28S рРНК, а также региона ITS (ITS1-5,8S-ITS2) рДНК *N. schikhobalowi* включала: деионизованная вода – 10,5 мкл; 10x буфер (Sileks, Россия) – 2 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 10 мМ, Sileks, Россия) – 1 мкл; прямой и обратный праймер (10 мкМ) – по 1 мкл; смесь colored Taq-полимеразы (2,5 единиц/мкл, Sileks, Россия) и Taq-полимеразы (5 единиц/мкл, Sileks, Россия) – по 0,25 мкл и 0,2 мкл соответственно; ДНК – 4 мкл. Амплификацию гена 18S рРНК проводили с парой праймеров 18S-E и 18S-F при следующих температурных и временных параметрах: предварительная денатурация (96°C – 5 мин); далее 35 циклов: 96°C денатурация – 1 мин, 58°C отжиг – 20 с, 72°C элонгация (синтез новых цепей) – 5 мин; терминальная элонгация (окончательная достройка цепей) 72°C – 10 мин. Для амплификации гена 28S рРНК использовали три пары праймеров: DigL2+1500R (температурные и временные параметры реакции: предварительная денатурация (94°C – 1 мин), далее 35 циклов: 94°C денатурация – 15 с, 55°C отжиг – 30 с, 72°C элонгация – 2 мин)), U1148+L2450 и U1846+L3449 с изменением ПЦР по количеству циклов – 40 и температуры отжига – 52°C (Рисунок 7). Амплификация ITS региона проходила при таких же температурных параметрах, с единственным отличием по температуре отжига (54°C – 30 с) с праймерами 1/F и DigL1.

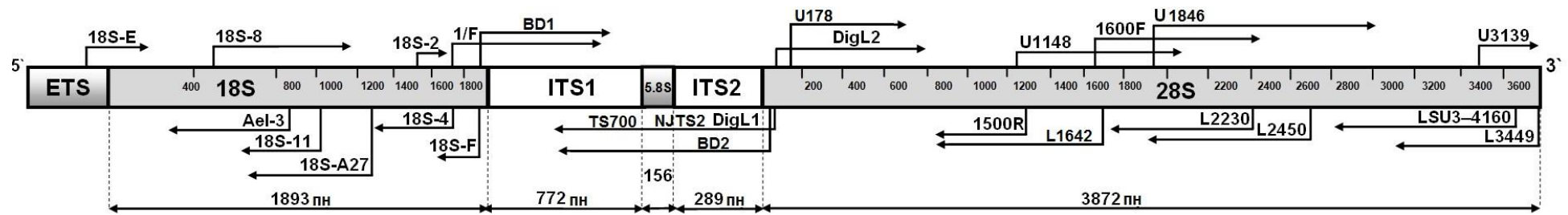


Рисунок 7. Стратегия амплификации и секвенирования последовательностей рибосомного кластера *Nanophyetus* spp.

ПЦР-амплификацию последовательностей гена *nad1* мтДНК *N. schikhobalowi* проводили с использованием пары праймеров: MB352 и MB399 (Criscione, Blouin, 2004). Реакцию ставили по описанной авторами схеме с DreamTaq-полимеразой (5 единиц/мкл, Thermo Scientific, США) (Criscione, Blouin, 2004). Амплификацию полноразмерного гена *nad1* мтДНК *N. schikhobalowi* проводили в несколько этапов. В одной пробе объемом 20 мкл содержалось: деионизованная вода – 11,8 мкл; 10x DreamTaq буфер (Thermo Scientific, США) – 2 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 10 мМ, Thermo Scientific, США) – 1 мкл; прямой и обратный праймер (10 мкМ) – по 0,5 мкл; DreamTaq-полимераза (5 единиц/мкл, Sileks, Россия) – 0,2 мкл; ДНК – 4 мкл. Температурные и временные параметры реакции с парой праймеров *nd1f1+nd1nanr* были следующие: предварительная денатурация (95°C – 3 мин), затем 30 циклов: 94°C денатурация – 45 с, 48°C отжиг – 30 с, 72°C элонгация – 2 мин; терминальная элонгация 72°C – 5 мин (Рисунок 8). Температура отжига варьировала в зависимости от пары используемых праймеров: для *nd3f+nd3rev3* (*nd1r2in*) и *nd1f⁺+nd1r⁺* она составляла 45°C, для *nd3f2+nd3r2* – 51°C.

Для амплификации генов и спейсерных областей рДНК *N. japonensis* использовали смесь Thermo Scientific PCR Master Mix (2x) (Калифорния, США), в соответствии с инструкцией изготовителя и температурными и временными параметрами, описанными выше. Для генов 18S и 28S рРНК, наборы праймеров: 18S-E+18S27; 892+18S4; 18S2+18SF и 178+1642; U1148+L2450; U1846+L3449 соответственно. Амплификацию ITS1+5,8S проводили с BD1 и двумя специально разработанными обратными праймерами TS700 и NJTS2_1149-R, а ITS2 амплифицировали отдельно с парой 3S+BD2 (Рисунок 8). ПЦР частичных последовательностей гена *nad1* мтДНК *N. japonensis* осуществляли со специально разработанной парой праймеров *nds-new2 + nds-newr*, и температурой отжига 49 °C. При каждой постановке амплификации использовали отрицательный контроль (реакционную смесь без добавления ДНК).

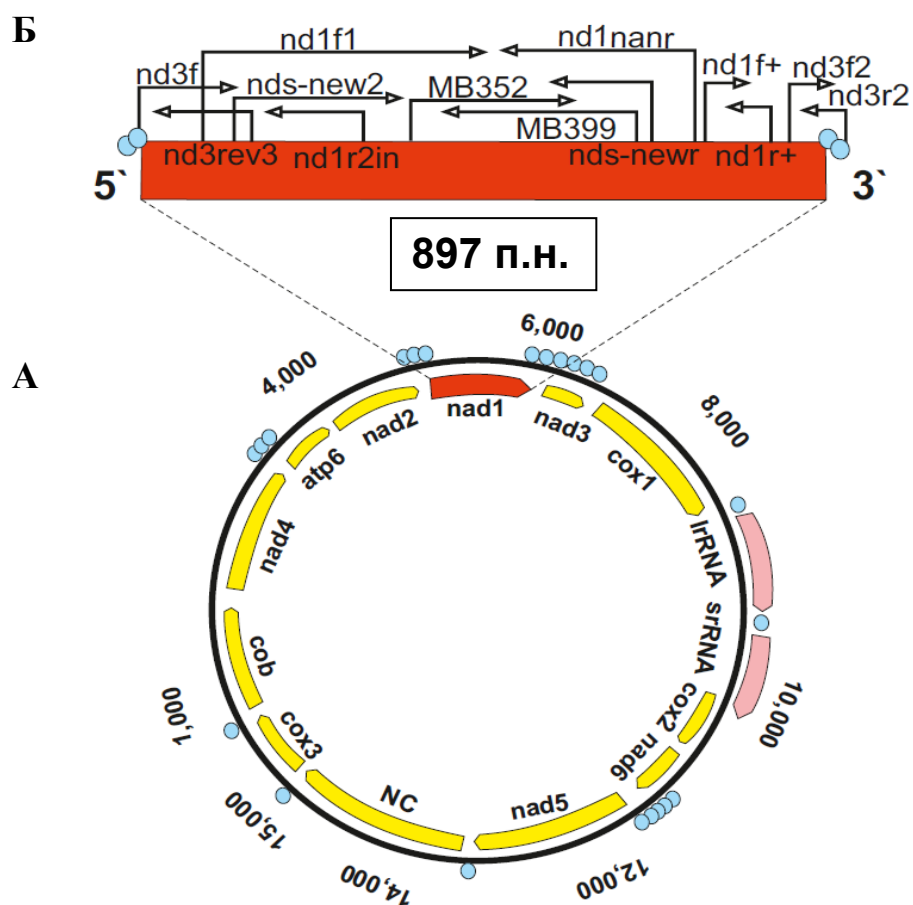


Рисунок 8. Схема митохондриального генома трематод (А) с изображением стратегии амплификации и секвенирования гена *nad1* мтДНК *N. schikhobalowi* (Б). Синими кружками обозначены гены, кодирующие тРНК.

ПЦР-реакции проводили в амплификаторе GeneAmp 9800 (Applied Biosystems, США). После проведения ПЦР производили проверку амплифицированных фрагментов методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле, приготовленном на 0,5X трис-боратном (ТВЕ) электродном буфере (44,5 мМ трис, 44,5 мМ борная кислота, 1,25 мМ ЭДТА), с окраской интеркалирующим красителем (этидиум бромидом) и визуализацией в УФ-свете (356 нм). Специфичность полос подтверждали их положением по отношению к контрольным маркерным фрагментам с молекулярной массой кратной 100 п.н. (Ladder 100 – 1000 п.н. ДНК, ООО «Интерлабсервис», Москва). Ампликоны очищали смесью ферментов щелочной фосфатазы и экзонуклеазы в соотношении примерно 1:3 (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent, Thermo Scientific, США).

2.4. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК

Определение последовательностей полученных фрагментов генов и спейсерных областей проводили с помощью ген-специфичных праймеров, которые использовались для амплификации, и с внутренними праймерами по схеме гнездовой ПЦР (Таблица 3). Секвенирование фрагментов осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по методике производителя. Реакционная смесь, объемом 10 мкл, для прямого и обратного праймера состояла из:

1. 6,25 мкл деионизированной воды;
2. 1,25 мкл 5X Sequencing Buffer;
3. 0,5 мкл 10 мкМ праймера;
4. 1 мкл BigDye Terminator Ready Reaction Kit v3.1;
5. 1 мкл ДНК матрицы.

Таблица 3. Список дополнительных праймеров для секвенирования

Праймеры	последовательность (5' – 3')	Ориентация	Ссылка
Ген 18S рРНК			
18S-8	GGTGCCAGCMGCCGCGGT	Прямой	Littlewood, Olson, 2001
Ael-3	GTATCTGATCGTCTTCGGC	Обратный	
ITS (ITS1+5,8S+ITS2)			
NJTS1_663F	АСАААТСССАТАТТАСАСТГТ	Прямой	Voronova, Chelomina, 2018
Ген 28S рРНК			
300F	СААГТАССГТГАГГГАААГТТГ	Прямые	Lockyer et al., 2003
900F	ССГТСТТГАААСАСГГАССААГ		
1200F	СССГАААГАТГГТГААСТАТГС	Обратный	
1200R	ГСАТАГТТКАССАТСТТТССГ		
U2229	ТАСССАТАТСССГСАГСАГГТСТ	Прямые	
U2562	АААСГГССГГГАГТААСТАТГА		
U2771	АГАГГТГАТГАТАРГТГГГА		
U3139	ААГТТАСССАГГГАТААСТАГГ СТ		
L2630	ГГГААТСТСГТТААТССАТТСА		
L2984	СТГАГСТСГССТТАГГАСАССТ		
LSU3-4160	ГГТСТАААСССАГСТСАСГТТСС С		

Реакцию проводили в следующих условиях: предварительная денатурация (1 мин – 96°C); для 30 циклов амплификации: денатурация при 96°C – 30 с, отжиг праймеров на матрице при температуре 55°C – 30 с, элонгация 60°C – 4 мин. Далее продукт очищали от невключенных флуоресцентных меток:

1 – В пробирки добавляли 1 мкл CH_3COONa (2,5 М), 1 мкл ЭДТА (0, 125 М) и 36 мкл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (96%) перемешивали и инкубировали при -20°C в течение 20 мин;

2 – Центрифугировали при 13200 об/мин в течение 30 минут, затем супернатант сливали;

3 – Проводили 1 – 2 отмывки 70% спиртом, центрифугируя по 10 мин при скорости 13,200 об/мин, супернатант сливали;

4 – Осадок высушивали.

Непосредственно перед секвенированием к осадку добавляли 12 мкл формамида Hi-Di™ (англ. highly deionized formamide), далее проводили денатурацию при 95°C в течение 3 минут с последующим охлаждением до +4°C. Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом геномном анализаторе ABI PRIZM 3130 (Applied Biosystems, США) на базе центра коллективного пользования Федерального Научного Центра Биоразнообразия ДВО РАН и ABI PRIZM 3130x1 и на базе Дальневосточного Федерального Университета.

2.5. Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей

Полученные нуклеотидные последовательности собирали и визуально проверяли на наличие ошибок по хроматограммам с помощью SnapGene Viewer 3.2.1 (SnapGene software, GSL Biotech, snapgene.com). Полноразмерные последовательности ITS+5,8S были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами *N. japonensis* – LT796171 – LT796186 (Voronova, Chelomina, 2018), *N. schikhobalowi* – MG965869 – MG965878, LT745950 – LT745964, LN852660 – LN852663, LN871800 – LN871815 (Voronova et al., 2017; Voronova, Chelomina,

2018), *N. salmincola* – KX990283 – KX990286 (Voronova et al., 2017); 18S рДНК *N. japonensis* – LT796167 – LT796168 (Voronova, Chelomina, 2018), *N. schikhobalowi* – LT745948 – LT745949, LN871816 – LN871817, MG966185 – MG966186, *N. salmincola* – KX990278 – KX990282 (Voronova et al., 2017); 28S рДНК *Nanophyetus japonensis* – LT796169 – LT796170 (Voronova, Chelomina, 2018), *N. schikhobalowi* – LN871818 – LN871821, MG966187 – MG966188 (Voronova et al., 2017). Основные списки видов трематод, анализируемых в данном исследовании, и номера доступа последовательностей в базе данных GenBank приведены в Приложениях I, II. Анализ, редактирование и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета MEGA 7 (Kumar et al., 2016), при выравнивании использовали алгоритм ClustalW, вложенный в программу (Thompson et al., 1994).

2.6. Статистическая обработка данных

Нуклеотидный состав и генетическую дивергенцию – генетические расстояния (d) между таксонами вычисляли, основываясь на значениях попарных нескорректированных p -дистанций (число нуклеотидных различий на сайт или доля не совпадающих при выравнивании остатков), в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Графики энтропии для полноразмерных последовательностей гена 18S рРНК, представляющие собой меру изменчивости нуклеотидов в заданном положении по отношению к длине всей выровненной последовательности, рассчитывали с использованием BIOEDIT 7.1.9 (Hall, 1999). Скорость нуклеотидных замещений (англ. nucleotide substitution rates) в гене 18S рРНК оценивали по соотношениям $N_v:N_c$ и $N_v:N_t$, где N_v – общее количество переменных сайтов в каждом домене, N_c – общее количество консервативных сайтов в каждом домене и N_t – общее число переменных сайтов во всех доменах (Ki, 2012). Графики и гистограммы для визуализации некоторых результатов, а также их статистическая обработка реализованы с помощью табличного процессора MS Excel 2016.

Перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные с последующим анализом кодонов осуществляли в программах MEGA 7 и DnaSP 5.10. Для трансляции белок-кодирующих последовательностей был использован митохондриальный генетический код плоских червей № 9.

Популяционное разнообразие было оценено с помощью стандартных статистик: количество рибо-/гаплотипов (H), полиморфных позиций (S), нуклеотидное (π) и рибо-/гаплотипическое (h) разнообразие (Nei, 1987) и среднее число попарных различий (k) (Tajima, 1983) в программах DnaSP 5.10 (Librado, Rozas, 2009) и ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005).

Распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями вычисляли с помощью анализа молекулярной дисперсии AMOVA (англ. Analysis of Molecular Variance) (Tajima, 1983) с 1000 пермутациями в программе ARLEQUIN v.3.11, используя стандартные F -статистики. Генетическую дифференциацию популяций вычисляли с помощью попарного индекса фиксации (F_{st}) в ARLEQUIN v.3.11. Достоверность каждого значения F_{st} тестировали с 1000 случайных пермутаций (Slatkin, Hudson, 1991). Проверка гипотезы об изоляции популяций расстоянием проведена с помощью теста Мантела (сравнение матриц F_{st} и географических расстояний между популяциями), реализованного в программе IBD 1.52 for Windows (Isolation by Distance) (Bohonak, 2002). Кроме того, в программе DnaSP 5.10 оценивали генный поток через число мигрантов Nm между популяциями по формуле: $Nm=(1-F_{st})/4F_{st}$ (Hudson et al., 1992).

2.7. Реконструкция демографической истории популяций

В программе ARLEQUIN 3.11 проведен демографический анализ популяционных выборок. Проверка селективной нейтральности наблюдаемого ДНК-полиморфизма осуществлена с помощью стандартных тестов, в основе которых лежит модель бесконечно большого числа сайтов: Tajima's D (Tajima, 1989) и Fu's F_s (Fu, 1997); p -значения были генерированы с помощью 10000 коалесцентных симуляций. Значения D (показывает степень несоответствия

между количеством сегрегирующих сайтов и средним числом попарных нуклеотидных замен последовательностей) и F_s (более чувствительный к присутствию синглетонных замен, появившихся после недавних мутаций) могут свидетельствовать о недавней популяционной экспансии, так как ее последствием является избыток низкочастотных гаплотипов со всеми новыми и редкими мутациями.

Наличие или отсутствие популяционной экспансии подтверждали характером распределения попарных генетических различий гаплотипов (mismatch-distribution). Чтобы сравнить наблюдаемое и ожидаемое распределение попарных различий для модели популяционной экспансии, в программе ARLEQUIN v.3.11 были рассчитаны значения индекса шероховатости Харпендинга (HRI) (Rogers, Harpending, 1992) и использована статистика среднеквадратичного отклонения (SSD). Значимость тестируемой статистики оценена после 1000 псевдослучайных реплик параметрического бутстрепа. Значения HRI ниже 0,05 предполагают демографическую экспансию популяции, а более высокие значения – бутылочное горлышко и стационарный размер популяции. Высокие значения SSD свидетельствует об отклонении от модели (Excoffier et al., 2005).

Для расчета времени возможных демографических экспансий получены значения временного коэффициента τ (время экспансии, соответствующее числу попарных отличий на этапе максимального роста численности популяции). Значение τ было переведено в абсолютное время в миллионах лет (t) по формуле: $\tau=2ut$, где u – скорость мутации, а t – время дивергенции в поколениях.

В дополнение к простым параметрическим моделям на основе данных о внутривидовых генеалогиях с помощью программ пакета BEAST 1.8.0 использовался метод контурной диаграммы (скайлайна) (англ. Bayesian skyline plot) (Drummond et al., 2005), чтобы отобразить изменение эффективного размера популяций с момента возникновения последнего общего предка (TMRCA) отобранных митохондриальных линий. Построены байесовские контурные диаграммы для популяций исследуемых видов при следующих условиях. Модель

нуклеотидных замещений – Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). Число групп, объединяющих относительно близкие коалесценции (подобрано на основе вычислений байесовского фактора для различного их числа), для суммарной выборки – 10. Модель молекулярных часов – «свободные» с некоррелированным логнормальным распределением скоростей нуклеотидных замен по ветвям древа. В модуле BEAUti (пакет BEAST 1.8.0) было задано значение скорости эволюции для гена *nad1* равное 2,8% за 1 млн. лет, поскольку калибровочных точек для семейства Troglotrematidae нет, были использованы данные для другого семейства трематод – Schistosomatidae (Attwood et al., 2008). За основу была взята скорость накопления мутаций 2,5% за 1 млн. лет, определенная Этвудом с соавторами для частичной последовательности гена *cox1* *Schistosoma mansoni* (Attwood et al., 2008). Общая протяженность байесовского анализа зависела от скорости достижения необходимого эффективного числа выборочных точек (более 200 для каждого из параметров модели) и составила 20 млн. циклов с отбором из них каждого 1000 (burn-in – первые 10% от их общего числа). Данные независимых симуляций были объединены и визуализированы в программе TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2013).

2.8. Моделирование вторичных структур транскриптов рДНК

Консенсусные структуры для набора выровненных последовательностей ITS1 и ITS2 были смоделированы с использованием RNAalifold на web-сервере <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi> (Bernhart et al., 2008). В этой программе значительно расширены стандартные алгоритмы динамического программирования. Энергетическое преимущество получают компенсаторные мутации, и ставится запрет на связывание несовместимых пар оснований. Поэтому, чем больше наблюдается мутаций, поддерживающих определенную пару оснований, тем больше доказательств в пользу того, что эта пара имеет право на существование по теории «вероятности спаривания оснований». RNAalifold генерирует структуры с минимальной свободной энергией, которой в термодинамическом равновесии обладают все «правильные»

модели (Hofacker et al., 1994). Входной файл представляет собой множественно выровненные последовательности в формате FASTA. Выходные данные в виде готовых MFE-структур (англ. minimal free energy; с минимальной свободной энергией) загружались в формате TIF напрямую с сервера. Для построения индивидуальных вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2 использовали традиционные программы RNAfold и Mfold 3.0 (Zuker, 2003) также доступные на web-серверах <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> и <http://unafold.rna.albany.edu> соответственно. В обоих случаях структуры отбирались в соответствии с универсальным принципом минимизации свободной энергии DG, где DG – количество энергии, необходимое для образования вторичных структур. РНК сворачивали при фиксированной температуре 37°C, а модели, выбранные нами из подмножества выходных файлов, сохраняли гомологию с ранее опубликованными структурами для других дигенетических сосальщиков (Morgan, Blair, 1995; Tatonova et al., 2012; Voronova et al., 2017). На структурах были обозначены консервативные и переменные сайты и произведен визуальный поиск семи регуляторных (TATAAT, CCAAT, GGCGG, CCCGCC, CCGCCC, GGGCGG, TGT TT) и пяти теломерных (TTAGGG, TTAGGC, TGTGGG, TTAGG, TCAGG) мотивов.

Вторичные структуры 18S рРНК были построены в согласовании с моделью вторичной структуры 18S рРНК *Triticum aestivum* по описанным выше принципам (DG) (Armache et al., 2010). Вторичные структуры 11 переменных доменов (ES3^S, ES6^S, ES7^S, ES9^S, ES12^S; h16, h17, h26, h39, h41, h44) 18S рРНК смоделированы в программе Mfold 3.0, используя метод минимально-энергетических состояний Цукера (Zuker, 2003).

Подготовку иллюстративного материала проводили в программе CorelDRAW X7 с применением метода визуального сравнения компенсаторных замен (Kjer, 1995). Использована нумерация переменных сайтов и спиралей по классификации предложенной Герби (Gerbi, 1996).

2.9. Определение предполагаемой структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы

2D и 3D модели третичной структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы реконструировали в программе доступной на портале PHYRE2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine). За основу брали трехмерную модель гомологичного белка респираторного комплекса млекопитающих – NADH-дегидрогеназный комплекс, также называемый комплекс I или NADH-убихинон-оксидоредуктаза. PHYRE2 использует выравнивание скрытых моделей Маркова (СММ), имитирующих работу процесса, похожего на марковский процесс с неизвестными параметрами, где задачей ставится разгадывание неизвестных параметров на основе наблюдаемых, а также включает нововведение – моделирование «ab initio folding» под названием «Poing» для воссоздания областей белков без видимой гомологии (Kelley et al., 2015). Белок анализировали с помощью набора утилит PHYRE2.

Для прогнозирования сайтов связывания с лигандами использовали 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>). Это автоматизированный метод, в основе которого заложен алгоритм идентификации, подобный CASP8 (англ. Critical Assessment of techniques for protein Structure Prediction). Гетерогенные лиганды, связанные с уже известными структурами, подобными запросу, накладываются на искомую модель и используются для прогнозирования сайта связывания. Достоверность модели подтверждается, если коэффициент корреляции Мэтью (MCC) не ниже 0,68, а коэффициенты перекрытия и точности достигают 71 и 60% соответственно (Wass et al., 2010).

2.10. Филогенетический анализ

Для реконструкции внутривидовых генеалогий по данным последовательностей *nad1* мтДНК использовали метод минимальных связей (MST) в программе ARLEQUIN 3.11. Медианные сети риботипов *Nanophyetus* spp. были сконструированы с использованием алгоритма median joining в Network 5.0 (Bandelt et al., 1999).

Внутриродовые филогенетические связи *Nanophyetus* spp. по данным ядерной рДНК и мтДНК реконструировали с помощью метода максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 7. Программу MrBayes 3.1 использовали для построения филогенетических древ методом Байеса (BI) (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Неоднозначно выровненные участки были исключены из филогенетического анализа. Модель нуклеотидных замен как для ML, так и для BI подбирали в программном обеспечении Modeltest 3.7 с помощью теста отношения правдоподобия (англ. likelihood ratio test, LR), используя байесовский информационный критерий (BIC) (Posada, Crandall, 1998). Для матриц ITS+5,8S (длина последовательностей примерно 1272 п.н.) применяли TVM+G или TPM2uf+G, для генов 18S (1822 п.н.), 28S (1255 п.н.) и полноразмерных последовательностей 28S рДНК (3917 п.н.) – TrN+I, TPM3uf+G и GTR+G модели соответственно. Для матриц гена *nad1* мтДНК (600 п.н.) модель нуклеотидных замен GTR+G выбрана наилучшей, как для ML, так и для BI-анализов.

Полученные по данным рДНК древа укореняли на соответствующие гены и спейсеры (ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, 18S рДНК и 28S рДНК) *Haplorchis pumilio* (AY245706; HM004195; HM004191) и *H. taichui* (HM004213) (Heterophyidae Looss, 1896). Виды рода *Haplorchis* были выбраны как представители семейства, которое является оптимально удаленным от Troglotreumatidae (Olson et al., 2003) для того, чтобы служить внешней группой. Филогенетические древа, полученные по данным мтДНК, укореняли на соответствующие последовательности *nad1* представителей семейства Opisthorchiidae: *Opisthorchis felineus* и *Clonorchis sinensis* (EU921260, DQ116944). Филогенетический анализ на основе аминокислотных последовательностей проводили методами объединения ближайших соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) в MEGA 7, используя *p*-дистанции и модель замещения JTT соответственно (Felsenstein, 1985).

Для анализа филогенетических связей дигеней на более высоком таксономическом уровне (п/отр. Xiphidiata и надсемейства Gorgoderoidea) использовали почти полноразмерные последовательности гена 18S рРНК

(Приложение I). Выровненные последовательности длиной 1890 п.н. (п/отр. Xiphidiata) и 1863 п.н. (надсемейство Gorgoderoidea) были объединены в две матрицы данных по 78 и 28 видов соответственно. Древа строили с помощью описанных выше методов ML и BI с подходящей моделью нуклеотидных замещений – GTR+I+G и укореняли на последовательности аспидогастрей (*Aspidogaster conchicola* (AJ287478), семейство Aspidogastridae, Poche, 1907). Ранее было показано, что аспидогастреи успешно использовались в качестве таксона внешней группы при широкомасштабных реконструкциях филогенетических связей трематод (Littlewood et al., 1999; Olson et al., 2003).

В MrBayes создавали 10 миллионов генераций цепей Маркова-Монте-Карло (MCMC) до достижения значения показателя стандартного отклонения ниже 0,01. Первые 25% древ использовались для отжига и исключались из дальнейшего анализа (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Оценку достоверности узлов проводили бутстреп-анализом (bootstrap percentage) с 1000 повторов для NJ и ML, и с использованием апостериорного критерия (posterior probabilities) в программе MrBayes.

2.11. Датировка дивергентных событий

Время дивергенции *Nanophyetus* spp. было установлено с помощью байесовского вывода (BI, Bayesian Inference), проанализировав наборы данных по генам 18S рРНК и неполным последовательностям *nad1* в пакете программ BEAST (1.8.2) (Drummond et al., 2012). Средний возраст узлов древ был оценен: (1) с 95% доверительным интервалом (highest posterior densities, HPDs), т.е. топологию древ считали достоверной, если значения апостериорных вероятностей (Bayesian Posterior Probability) в узлах равнялись 0,95 и выше; (2) при «свободных» молекулярных часах (relaxed molecular clock); (3) с помощью универсального параметра Yule Prior (Lemey et al., 2009). Использовали оптимальную модель нуклеотидных замещений НКУ+G в пакете BEAST BEAUti (1.8.2) (Drummond et al., 2012). В отсутствии конкретной информации о скоростях мутаций для наших видов применяли некоррелированное логнормальное распределение (uncorrelated lognormal) относительно ветвей древ со средним

значением 1 и стандартным отклонением 0,33, что обеспечивало автоматическую оптимизацию по мере продвижения цепей МСМС. Время обнаружения яиц трематод в копролитах раннемеловых архозавров было взято за основную калибровочную точку (примерно 125,93 млн.л.н.) (Poinar, Voucot, 2016). Это соответствовало консенсусной оценке даты дивергенции от их последнего общего предка (англ. most recent common ancestor – MRCA). Согласно молекулярным часам, вычисленным для *Schistosoma* (Attwood et al., 2008), мы использовали еще одну калибровочную точку 6 млн.л.н., этот возраст был установлен как минимум для MRCA *Nanophyetus* spp. Для исследования паразито-хозяйинных ассоциаций Salmonidae и *Nanophyetus* spp. и их коэволюции мы включили в анализ нуклеотидные последовательности *nad1* 19 видов различных лососевых и карповых рыб (Приложение III); для укоренения древа использовалась последовательность *Dallia pectoralis* (Crespi, Fulton, 2003). Основываясь на гораздо более древней истории некоторых эволюционных событий лососевых, возраст 59 млн. лет был установлен для MRCA рыб. Вторую калибровочную точку определили по времени дивергенции 15 – 20 млн.л.н. родов *Salmo* и *Oncorhynchus* (Cretene-Lafreniere et al., 2012). Длину цепей Маркова для всех анализов устанавливали равной 10 млн. поколений с отбором каждого тысячного состояния и значением отжига burn-in 10%. Значения показателя ESS (effective sample size) для каждого параметра при этом были более 200. TRACER 1.6 – графический инструмент для визуализации и диагностики выходных данных МСМС использовался для проверки стационарного распределения цепей, ошибок и доверительных интервалов (Rambaut et al., 2013). Байесовские филогенетические древа суммировали в программе TreeAnnotator (пакет BEAST 1.8.2), используя алгоритм maximum clade credibility (MCC), и затем визуализировали с помощью программы FigTree 1.3 (Rambaut, 2014). Для повышения достоверности все построения проводили по три раза, воспроизводя аналогичные результаты.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе исследовано 390 нуклеотидных последовательностей; из которых 133 нуклеотидных последовательности гена 18S рРНК (в среднем 1870 п.н.), 63 нуклеотидных последовательности участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК (в среднем 1200 п.н.), 28 нуклеотидных последовательностей гена 28S рРНК (в среднем 1300 п.н.) и 166 нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *nad1*, из которых 15 полных последовательностей (в среднем 900 п.н.), остальные последовательности представляли собой фрагменты гена *nad1* длиной 621 п.н.

3.1. Анализ рибосомного кластера

Для 8 образцов *Nanophyetus schikhobalowi* и *N. japonensis* определены полноразмерные нуклеотидные последовательности генов 18S рРНК и 28S рРНК, а для 61 образца трех видов определены полноразмерные нуклеотидные последовательности региона ITS1-5,8S-ITS2 рДНК. Общая длина анализируемых участков рДНК составила 7082 п.н., 7107 п.н. и 4298 п.н. для *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно.

3.1.1. Нуклеотидные последовательности ДНК

3.1.1.1. 18S рДНК

Полный размер 18S рДНК для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, по нашим данным, составил 1980 п.н. Последовательности 18S рДНК для *N. salmincola*, взятые из GenBank, были короче на 187 п.н. – 1793 п.н. (Рисунок 9).

Для представителей каждого вида GC-содержание в генах 18S рРНК не отличалось и составило $51,4 \pm 0,4\%$. Выровненные последовательности 18S рДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* отличались по одному нуклеотиду: А→С трансверсия по 702 сайту ($d=0,05\%$). 18S рДНК последовательности *N. japonensis* отличались от таковых *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* по 3 ($d=0,17\%$) и 4 ($d=0,22\%$) нуклеотидам соответственно. В первом сравнении это были транзиции:

A→G по 114 сайту и две C→T по 1382 и 1405 сайтам; во втором – аналогичные транзиции и одна трансверсия A→C по 702 сайту.

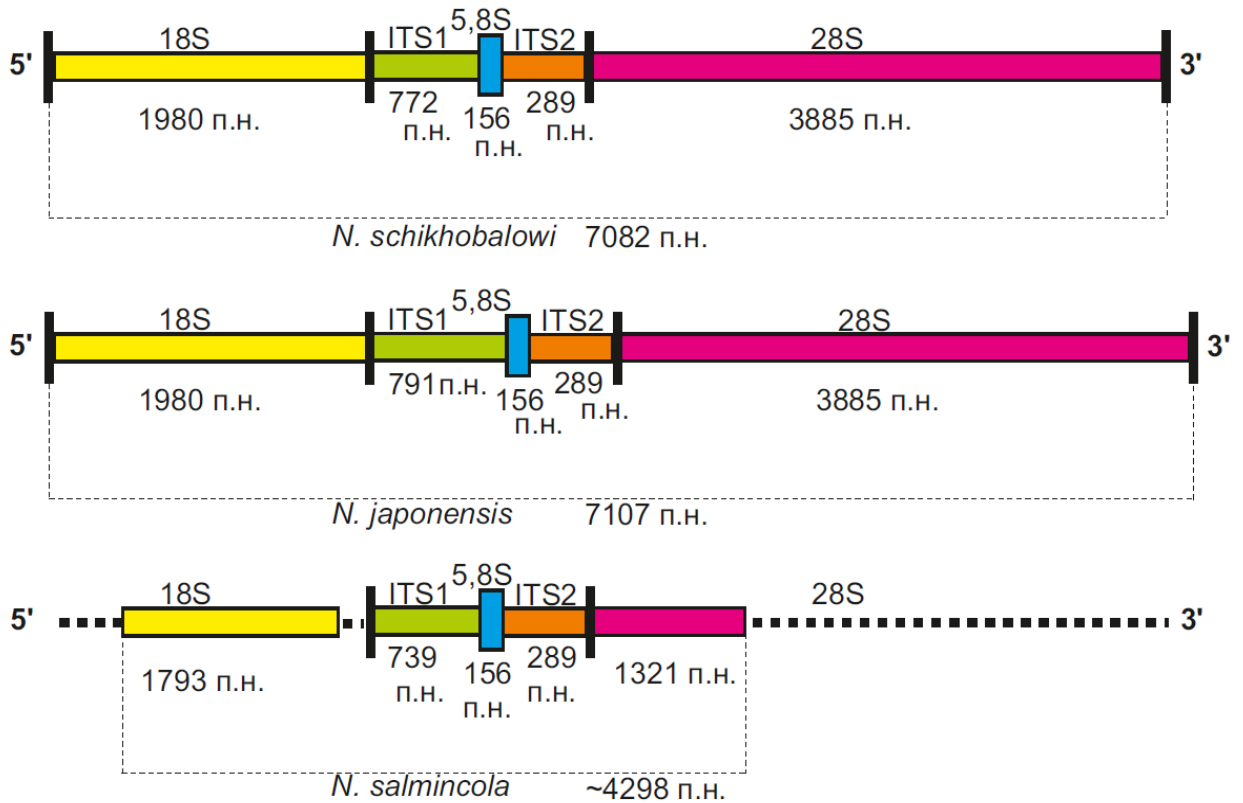


Рисунок 9. Схематичное изображение секвенированного в данной работе рибосомного кластера трех представителей *Nanophyetus* с точным указанием длин каждого участка рДНК. Жирными пунктирными линиями обозначены недостающие участки последовательностей.

3.1.1.2. 28S рДНК

Полноразмерные последовательности гена 28S рРНК для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* составили 3885 п.н. (Рисунок 9); GC-содержание было одинаково: $51,0 \pm 0,99\%$. GC-содержание выровненных последовательностей 28S рДНК относительно 1321 п.н. фрагмента *N. salmincola* (данные GenBank) составило $53,6 \pm 0,03\%$ и $53,9 \pm 0,03\%$ для *N. schikhobalowi* с *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно. При сравнении полных нуклеотидных последовательностей 28S рДНК *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* было найдено 4 трансверсии: две G→C по 2140 и 3010 сайтам, две A→T по 1410 и 3672 сайтам, что составило всего 0,1% различий. Частичные нуклеотидные последовательности 28S рДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* отличались по 8 положениям: одна делеция (522

сайт), три транзиции А→G по 49, 454 и 737 сайтам, две транзиции Т→С по 532 и 834 сайтам, и две трансверсии А→Т по 520 и 530 сайтам ($d=0,5\%$). Частичные последовательности генов 28S рРНК у *N. japonensis* отличались по 1 ($d=0,07\%$) и 8 ($d=0,6\%$) нуклеотидным положениям при сравнении с *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* соответственно. Причем семь замен были теми же, что при сравнении последовательностей 28S рДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*; появилась одна дополнительная замена, трансверсия Т→А, по 1322 сайту.

3.1.1.3. ITS1-5,8S-ITS2 рДНК

Размер полного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК составил 1219 п.н. для *N. schikhobalowi*, 1186 п.н. для *N. salmincola* и 1238 п.н. для *N. japonensis*. GC-содержание ITS1-5,8S-ITS2 рДНК для всех трех видов было одинаковым, $49,8\pm 1,1\%$. Из-за инделей размер ITS1 участка варьировал и составил 772 п.н., 791 п.н. и 739 п.н. для *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно (Рисунки 10, 11). При сравнении ITS1 у *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* мы обнаружили 15 инделей с общей длиной 139 п.н. Последовательности ITS1 *N. japonensis* отличались от *N. schikhobalowi* инсерцией в 19 п.н. При сравнении ITS1 *N. japonensis* и *N. salmincola* обнаружено 14 инделей разного размера, с общей длиной 121 п.н. Таким образом, около 17% длины ITS1 приходилось на индели. Размеры последовательностей гена 5,8S рРНК и участка ITS2 для *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* были одинаковыми и составили 156 п.н. и 290 п.н. соответственно. GC-содержание гена 5,8S рРНК для трех видов трематод не отличалось и составило $49,3\pm 0,01\%$, а участка ITS2 – $54,0\pm 0,14\%$.



Рисунок 10. Схематичное изображение выровненного участка ITS1 трех представителей *Nanophyetus*. Деления в последовательностях обозначены прямыми линиями.

		4	7	8	9	10	11	14	15	16	17	20	21	22	23	24	25	28	29	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49	50	51	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66																						
1	LT745950	T	A	G	A	A	A	C	C	A	A	A	A	G	C	A	A	G	C	C	G	A	C	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	A	G	C	A	G	A	C	C	A	A	T	G	A																				
2	LT745954	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																				
3	LT745953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C																				
4	LT745956	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																				
5	LN852661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																				
6	LT796172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G																				
7	LT796173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G																				
8	KX990283	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	A	A	G	A	C	T	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																					
9	KX990284	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	A	A	G	A	C	T	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																					
		67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	85	86	108	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	153	161	171	182	183	190	191	192																						
1	LT745950	G	T	A	G	T	C	A	T	A	C	T	C	G	T	T	G	A	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	-	-	C	G	A																		
2	LT745954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																
3	LT745953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-															
4	LT745956	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
5	LN852661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
6	LT796172	G	.	T	T	T	T	A	T	A	G	C	G	A	G	C	T	C	A	G	G	G	.	T	-	-	-	-	-																						
7	LT796173	G	.	T	T	T	T	A	T	A	G	C	G	A	G	C	T	C	A	G	G	G	.	T	-	-	-	-	-																						
8	KX990283	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	C	T	T	T	T	A	T	A	G	C	G	G	G	C	T	C	A	G	A	T	T	G	.	A	T	-	-	-																					
9	KX990284	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	C	T	T	T	T	A	T	A	G	C	G	G	G	C	T	C	A	G	A	T	T	G	.	A	T	-	-	-																					
		193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	233	234	263	264	265	266	267	268	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289																						
1	LT745950	A	A	A	A	A	A	G	A	G	C	T	A	C	C	C	T	A	A	A	G	C	T	C	A	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	LT745954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
3	LT745953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
4	LT745956	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	LN852661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	LT796172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	LT796173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	KX990283	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	A	T	A	T	A	T	G	G	A	A	C	G	A	G	G	G	C	G	C	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-													
9	KX990284	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	A	T	A	T	A	T	G	G	A	A	C	G	A	G	G	G	C	G	C	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
		290	291	292	294	300	349	357	358	361	363	364	371	404	417	418	458	506	554	584	622	627	628	629	630	634	636	663	692	755	800	804	807	824																																				
1	LT745950	-	-	-	T	A	G	A	A	G	T	G	A	C	T	C	G	G	A	C	C	T	G	T	T	A	A	G	G	G	G	C	T	T																																				
2	LT745954	-	-	-																																			
3	LT745953	-	-	-																																				
4	LT745956	-	-	-																																				
5	LN852661	-	-	-																																				
6	LT796172	-	-	-	G																																				
7	LT796173	-	-	-																																				
8	KX990283	G	C	A	A	.	T	G	G	T	C	A	G	A	C	T	T	C	C	T	T	-	-	-	-	G	G	A	A	.	A	T	C	C																																				
9	KX990284	G	C	A	A	.	T	G	G	T	C	A	G	A	C	T	T	C	C	T	T	-	-	-	-	G	G	A	A	.	A	T	C	C																																				

Рисунок 11. Полиморфные сайты полноразмерных нуклеотидных последовательностей ITS1.

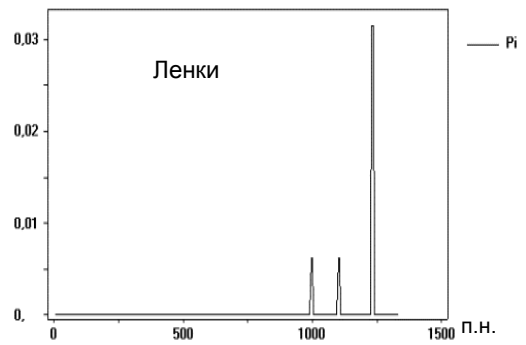
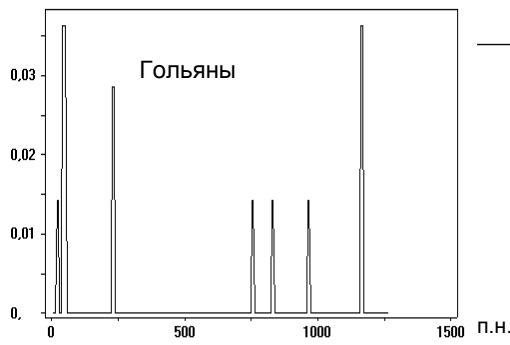
(1 – 5) – *N. schikhobalowi*, (6 – 7) – *N. japonensis* и (8 – 9) – *N. salmincola*. Точками обозначены одинаковые нуклеотиды; затененные участки – индели.

Последовательности участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. schikhobalowi* из разных локалитетов отличались между собой 9 нуклеотидными заменами ($d=0,7\%$): четыре G↔C трансверсии и одна G↔A транзиция локализовались в ITS1, две G↔C трансверсии – в гене 5,8S рРНК, и по одной трансверсии G↔C и G↔Т – в ITS2. Распределение нуклеотидной изменчивости от 5' к 3'-концу ITS1-5,8S-ITS2 последовательностей в выборках *N. schikhobalowi* из разных рек и разных видов рыб-хозяев отличалось. У особей, извлеченных из лососевых, изменчивость наблюдалась только в участке ITS2, а у нанофиетусов из карповых рыб – как в ITS1, так и в ITS2 участках (Рисунок 12А). Причем нуклеотидная изменчивость особей из одного и того же вида хозяина из разных рек локализовалась в разных позициях (Рисунок 12Б).

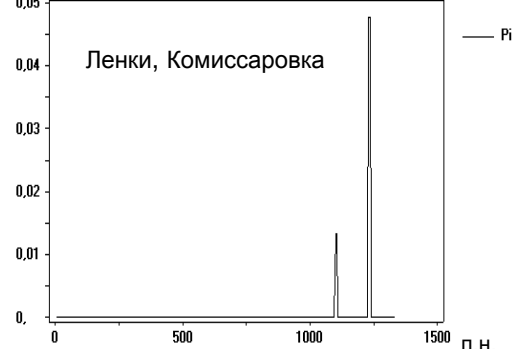
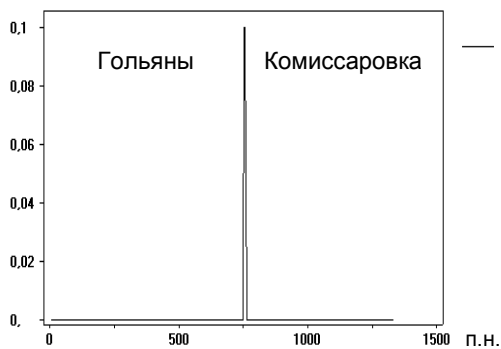
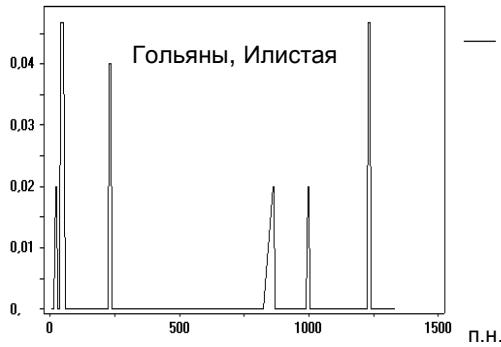
Все последовательности *N. salmincola* оказались идентичными. Участки ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. japonensis* отличались между собой по 3 нуклеотидам ($d=0,1 - 0,2\%$), демонстрируя три типа замен: А↔G транзицию внутри ITS1, трансверсии G↔C и А↔Т, локализованные в гене 5,8S рРНК и в прилегающем к ней участке ITS2 соответственно (Рисунок 12В).

Межвидовые и внутривидовые замены в ITS1-5,8S-ITS2 *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* обнаруживались преимущественно в одних и тех же областях, однако их профили существенно отличались (Рисунки 12В, Г). Между последовательностями *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* различия включали 16 нуклеотидных замен (в основном транзиции А↔G (40%) и трансверсии С↔G (40%)). При сравнении *N. salmincola*, как с *N. japonensis*, так и с *N. schikhobalowi* большинство замен было выявлено в центральной части ITS1, консервативной у *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* (Рисунок 12Г). Из 40 замен (в основном транзиции А↔G (37%) и Т↔С (29%)) между последовательностями *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* 27 локализируются в ITS1, 5 – в гене 5,8S рРНК, и 8 – в ITS2. Последовательности участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. salmincola* и *N. japonensis* отличались по 41 нуклеотидной замене (в основном транзиции А↔G (42%) и Т↔С (24%)), 29 из которых локализируются в ITS1, 4 – в гене 5,8S рРНК, 8 – в ITS2.

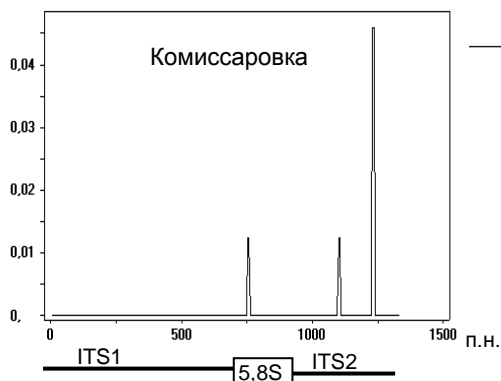
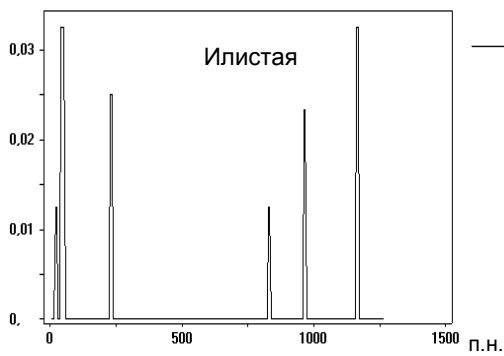
А



Б



В



Г

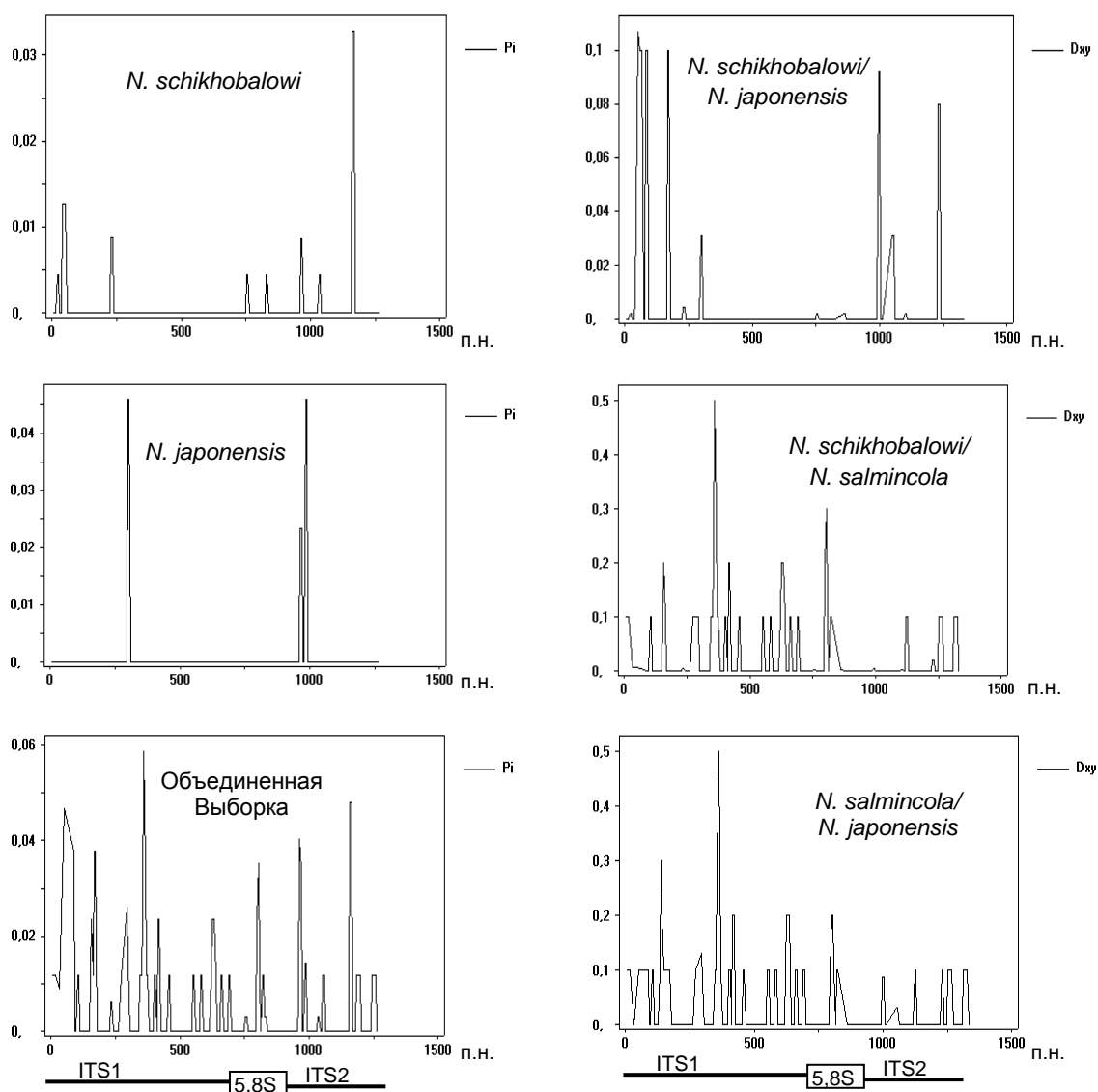


Рисунок 12. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в последовательностях полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *Nanophyetus* spp. по хозяевам (А); хозяевам из различных дальневосточных локалитетов (Б); дальневосточным локалитетам (В); различным географическим регионам (Г), D_{xy} – среднее число замен на нуклеотидный сайт между популяциями.

Параметры генетической изменчивости отличались как между региональными, так и локальными выборками; максимальные значения среди видов получены для *N. japonensis*, и локальных популяций *N. schikhobalowi* – для выборки из реки Илия и выборки из гольянов (Таблица 4). Для объединенной выборки нанофиетусов значения параметров нуклеотидной изменчивости (π) и риботипического разнообразия (H_d) были значительно выше и составляли

0,00523±0,00145 и 0,775±0,048 соответственно. Генетическое расстояние между последовательностями ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* достигало 13,3% (включая все типы замен и индели), между *N. salmincola* и *N. japonensis* составляло 12%, а между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* – 2,6%.

Таблица 4. Описательная статистика генетической изменчивости последовательностей полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК представителей *Nanophyetus* spp.

Выборка	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i>	<i>S</i>	π	<i>k</i>	<i>D</i>
Популяции <i>N. schikhobalowi</i>							
Комиссаровка	17	4	0,596±0,099	3	0,00055±0,00012	0,676	0 - 0,002 (0,001)
Илистая	16	8	0,808±0,093	7	0,00113±0,00024	1,383	0 - 0,002 (0,001)
Павловка	10	1	0,000±0,000	0	0,00000±0,00000	0,000	0,000
Комаровка	2	2	1±0,500	1	0,00082±0,00041	1,000	0,001
Ленки	32	4	0,413±0,094	3	0,00036±0,00000	0,440	0 - 0,002 (0,001)
Гольяны	13	8	0,897±0,067	8	0,00139±0,00000	1,692	0 - 0,002 (0,001)
Региональные популяции							
<i>N. schikhobalowi</i>	45	10	0,589 ± 0,078	9	0,00066±0,00000	0,808	0 - 0,002 (0,001)
<i>N. salmincola</i>	4	1	0,000 ± 0,000	0	0,00000±0,00000	0,000	0,000
<i>N. japonensis</i>	16	5	0,775 ± 0,082	3	0,00093±0,00014	1,150	0 - 0,002 (0,001)

n – количество последовательностей; *H* – количество риботипов; *Hd* – генотипическое разнообразие (\pm S.D.); *S* – количество полиморфных сайтов; π – нуклеотидная изменчивость (\pm S.D.); *k* – среднее количество попарных отличий; *D* – диапазон *p*-расстояний, среднее значение указано в скобках.

Fst-статистика выявила высокую генетическую подразделенность между географическими регионами, представленными разными видами (*Fst*=0,966 – 0,995, *P*<0,05), и ожидаемо низкую и статистически не подтвержденную,

дифференциацию между локальными популяциями *N. schikhobalowi*, за исключением Комаровки при сравнении с Павловкой ($F_{st}=0,687$, $P<0,05$) (Таблица 5). Интересно, что между выборками из ленков и гольянов обнаружена небольшая, но статистически значимая генетическая дифференциация.

Таблица 5. Попарные индексы фиксации (F_{st}) между популяциями *Nanophyetus* spp., рассчитанные по участку ITS1-5,8S-ITS2

Региональные популяции	F_{st}
<i>N. schikhobalowi</i> / <i>N. japonensis</i>	0,966*
<i>N. schikhobalowi</i> / <i>N. salmincola</i>	0,995*
<i>N. japonensis</i> / <i>N. salmincola</i>	0,994*
Локальные популяции	F_{st}
Илистая/Павловка	0,041
Комиссаровка/Павловка	0,120
Комиссаровка/Илистая	0,023
Комаровка/Павловка	0,687*
Комаровка/Илистая	-0,179
Комаровка/Комиссаровка	-0,263
Хозяева	F_{st}
Ленки/Гольяны	0,052*

Статистическая поддержка * – $P < 0,05$

В объединенной выборке для полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК идентифицировано 16 риботипов: 10 (R1 – R10) для *N. schikhobalowi*, 5 (R11 – R15) – для *N. japonensis*, и один риботип R16 – для *N. salmincola* (Рисунок 13). Общих для видов *Nanophyetus* риботипов найдено не было. Единственным мажорным для *N. schikhobalowi* является риботип R1 – 62,3%, второе место делят риботип R2 – 17,7% и остальные вместе взятые минорные риботипы, составляющие около 20%. R1 представлен с различной частотой, от 43,7% до 100%, в разных локальных популяциях *N. schikhobalowi* (Рисунок 13). R2 присутствует в выборках из Илестой, Комиссаровки и Комаровки с частотами 12,5; 29,5 и 50,0% соответственно. По одному уникальному риботипу R6 и R10 встречается только в выборке из реки Комиссаровка. Наибольшее число

риботипов выявлено для выборки из Иистой (представлено 8 риботипов из 10 для вида). Для *N. japonensis* риботип R13 является мажорным и составляет 43,7%.

Несмотря на то, что выборка нанофиетусов, извлеченных из карповых рыб, меньше, их риботипическое, как и нуклеотидное разнообразие, значительно выше, особенно тех образцов, чьими хозяевами являются гольяны, выловленные в Иистой (Рисунок 13). Риботипы R1 и R2 встречаются у нанофиетусов, хозяевами которых являются как лососевые, так и карповые рыбы, в соотношении 81,2% и 12,6%, и 15,5% и 30,7% соответственно (Рисунок 13). Других общих риботипов обнаружено не было. Мажорным для трематод из ленков был риботип R1, он же представлен во всех локальных выборках. Для нанофиетусов из гольянов мажорным является риботип R2 – 30,7%, а процент минорных составил 53,8. Также нами были выделены хозяиноспецифичные риботипы: R6 и R9 для выборки из ленков и R3, R4, R5, R7, R8 и R10 для выборки из гольянов.

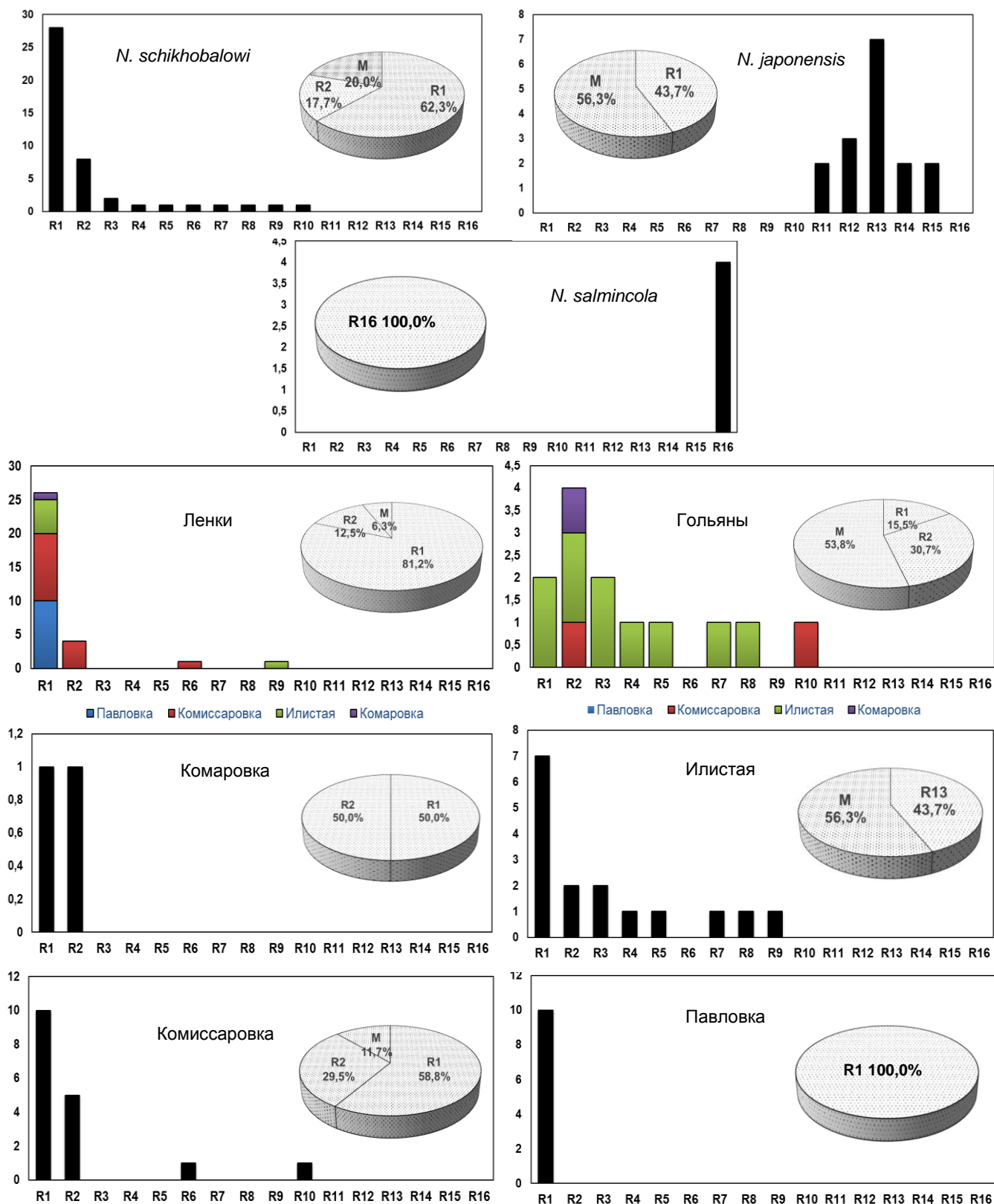


Рисунок 13. Частоты риботипов полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК для образцов *Nanophyetus* spp., распределенные по локалитетам и хозяевам. Ось x – номер риботипа, ось y – количество нуклеотидных последовательностей, представляющих риботип. Процентное соотношение мажорных и минорных риботипов отображено на диаграммах, где R – мажорный риботип, M – минорные риботипы.

МН-сеть для полной последовательности участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК объединенной выборки (n=65) разделяет риботипы *N. schikhobalowi*, *N. japonensis*, *N. salmincola* по отдельным удаленным друг от друга кластерам, которые соединены между собой через три гипотетических риботипа (Рисунок 14). Предположительно предковым для *N. japonensis* и *N. schikhobalowi*, а также отдельно для нанофиетусов, выделенных из ленков и голянов являются мажорные риботипы R13 и R1, соответственно, находящиеся в центре звездчатых структур.

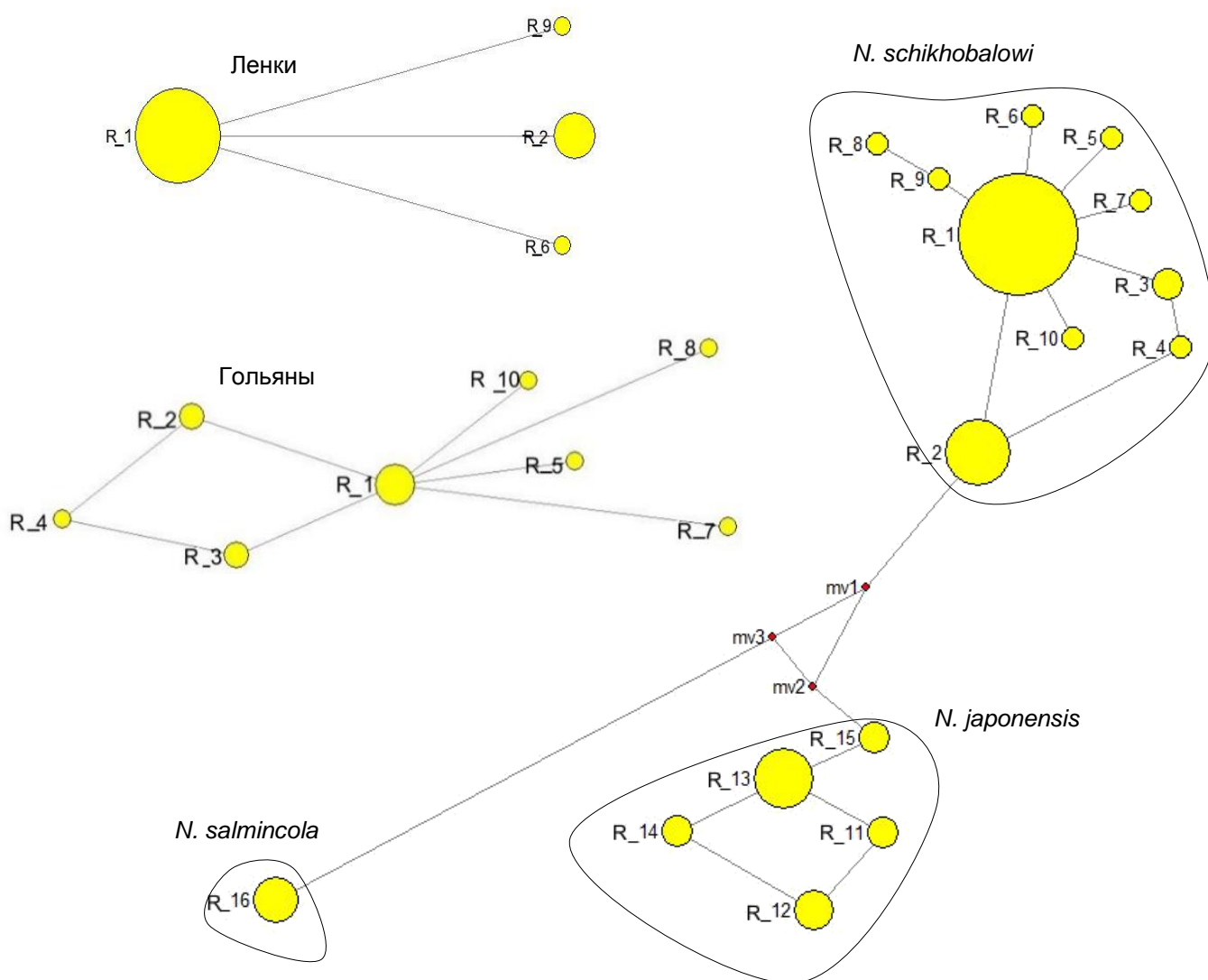


Рисунок 14. Медианная сеть для риботипов ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *Nanophyetus* spp. Желтые круги обозначают риботипы, mv1 – mv3 – гипотетические риботипы, сгенерированные в программе Network ver. 5.0.0.3. Размер круга пропорционален частоте встречаемости риботипа.

В анализируемых последовательностях участков ITS1 и ITS2 были выявлены четыре регуляторных (CCAAT (pro2), GGCGG (box1), CCGCCC (box3), TGTTT (fox)) и два теломерных (TGTGGG (tel3), TCAGG (tel5)) мотива. Мотивы в спейсерах *N. japonensis* в точности повторяют мотивы в спейсерах *N. schikhobalowi*, за исключением второго tel5, локализованного во вставке ITS1. В ITS1 *N. schikhobalowi* в отличие от *N. salmincola* локализовано по два pro2. Кроме того у *N. salmincola* box1 представлен дважды, а в участке ITS2 *N. schikhobalowi* дополнительно есть fox-мотив.

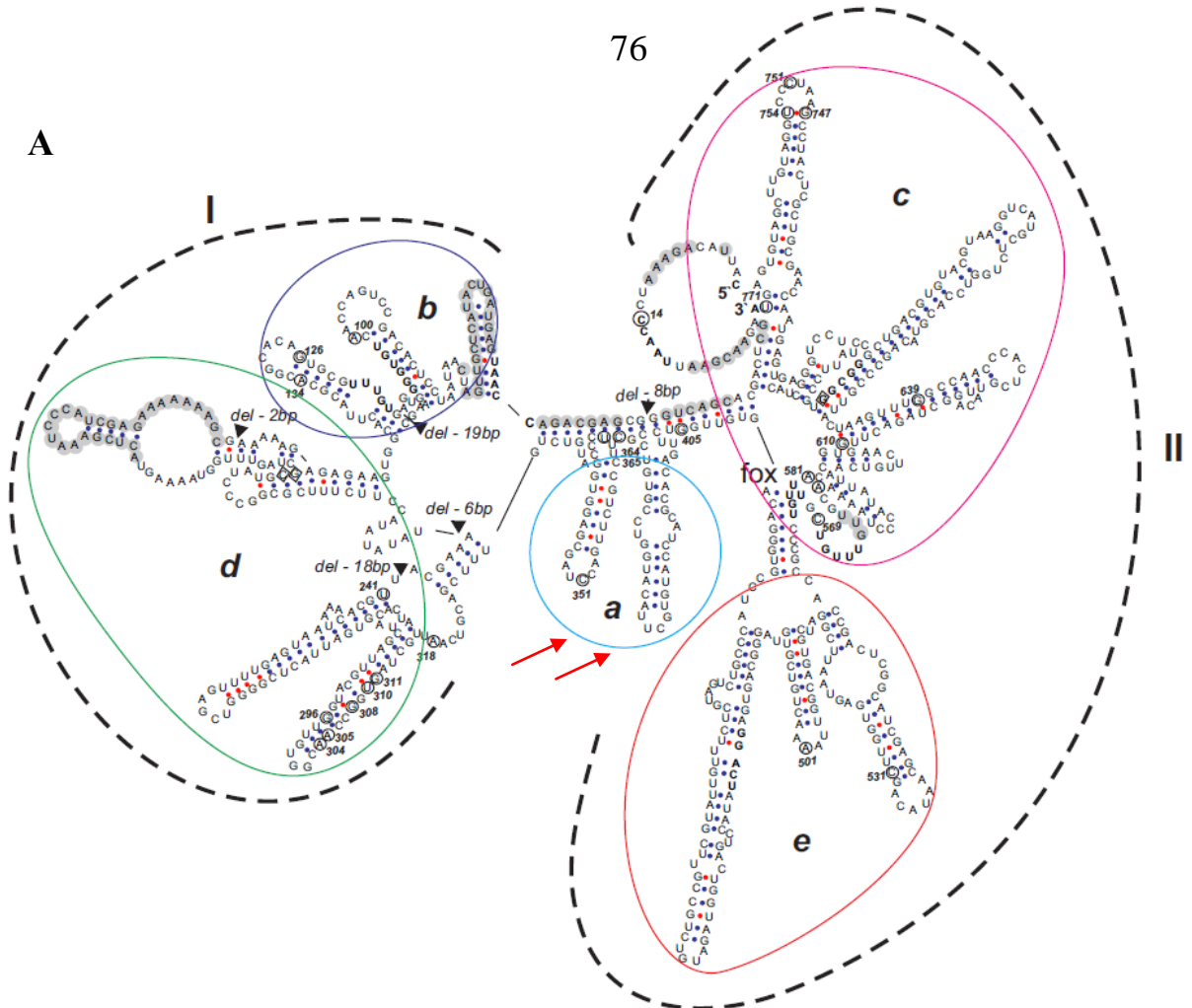
3.1.2. Вторичные структуры транскриптов спейсерных участков рДНК

В данной работе были смоделированы консенсусные вторичные структуры для объединенной выборки полноразмерных ITS1 и ITS2 рДНК транскриптов *Nanophyetus* spp. (Рисунки 15 – 17). Энергетические характеристики, отражающие надежность прогнозирования моделей, представлены на диаграммах «Mountain plots» в Приложениях IV, V. Вторичные структуры (SS) ITS1 имеют древовидную конформацию, где отчетливо выделяются две ветви, с различным числом шпилек, формирующих пять структурных элементов (*a* – *e*) разной степени вариабельности, и отделенные друг от друга спиралью (Рисунок 15). У *N. schikhobalowi* в первой ветви (I), расположенной ближе к 5'-концу ITS1, содержится 6 шпилек (элементы *b* и *d*), у *N. salmincola* – 7, а у *N. japonensis* – 8 шпилек. Первая ветвь, была более изменчивой и вмещала большинство нуклеотидных замен, вторая ветвь (II) – более консервативная, она включала спиральные структуры, напоминающие трезубец (элемент «*e*»). Ветвь II у всех трех видов помимо «трезубца» включала абсолютно неизменный по числу длинных шпилек элемент «*c*». Наиболее примечательное отличие вторичных структур ITS1 *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* от *N. salmincola* – это присутствие двух шпилек средней длины в составе спирали, соединяющей две ветви вторичной структуры (элемент «*a*»). У *N. salmincola* эти шпильки имеют смещенную локализацию и включены в ветвь II; предположительно это может

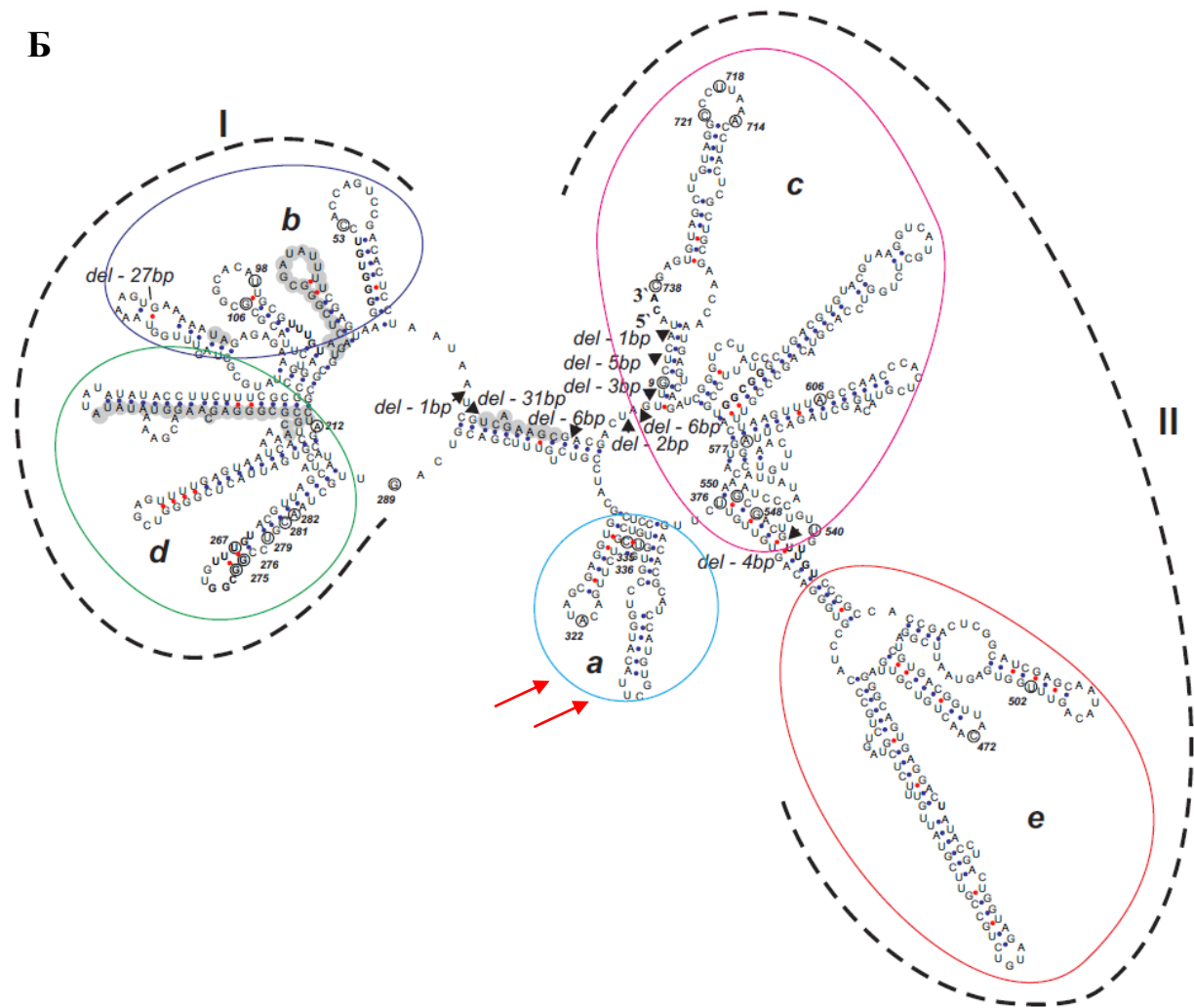
служить для стабилизации всей вторичной структуры ITS1 *N. salmincola*, поскольку (помимо этих двух шпилек) в ветви II у этого вида присутствует 3 длинных шпильки (элемент *c*) (как у *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*) и только две коротких, вместо 4х. Аналогичная картина наблюдалась в MFE-моделях, полученных из утилиты Mfold (Приложение VI). Показатели DG в двух приложениях варьировали от -276,3 до -264,2 в RNAalifold и от -241,2 до -237,3 ккал/моль в Mfold (соответственно для *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*). У *N. japonensis* обнаруженная вставка длиной 19 п.н. почти полностью сформировала дополнительную шпильку, локализованную в ветви I, подобно *N. salmincola*. Свободная энергия DG, необходимая для фолдинга оптимальной вторичной структуры ITS1 *N. japonensis*, была равной -283,30 ккал/моль (RNAalifold), что несколько ниже энергий структур, полученных для *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*.

На вторичных структурах ITS1 *Nanophyetus* spp. видно, что как регуляторные, так и теломерные мотивы распределены относительно равномерно по ветвям I и II. Тем не менее, существуют межвидовые отличия по их количеству и локализации. Мотив pro2 локализован в центральной части *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, а у *N. salmincola* он отсутствует. GC-боксы имеются в ветви II у *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, в ветвях I и II у *N. salmincola*. Только теломерные и fox последовательности присутствуют в обеих ветвях у всех видов.

A



Б



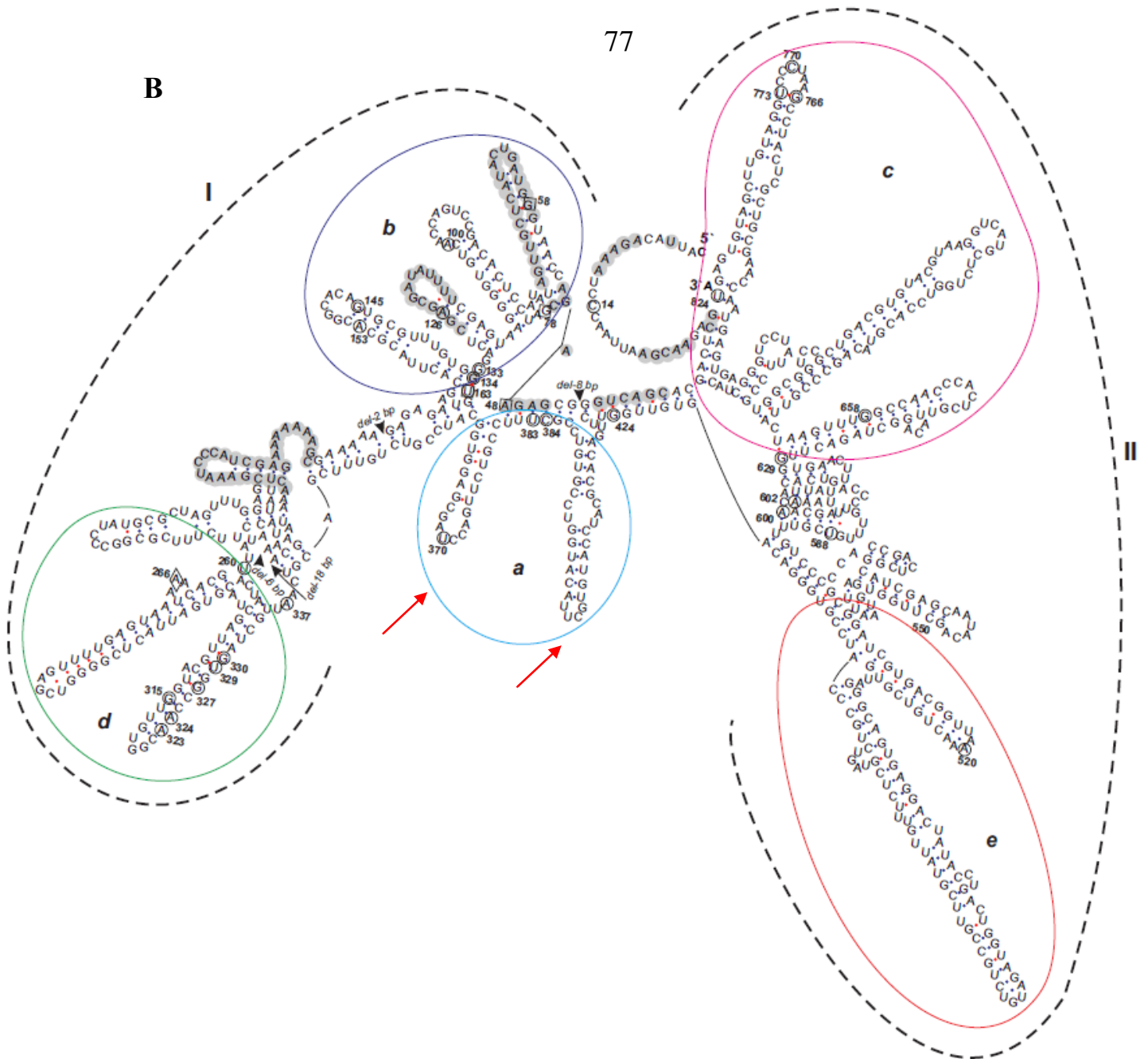
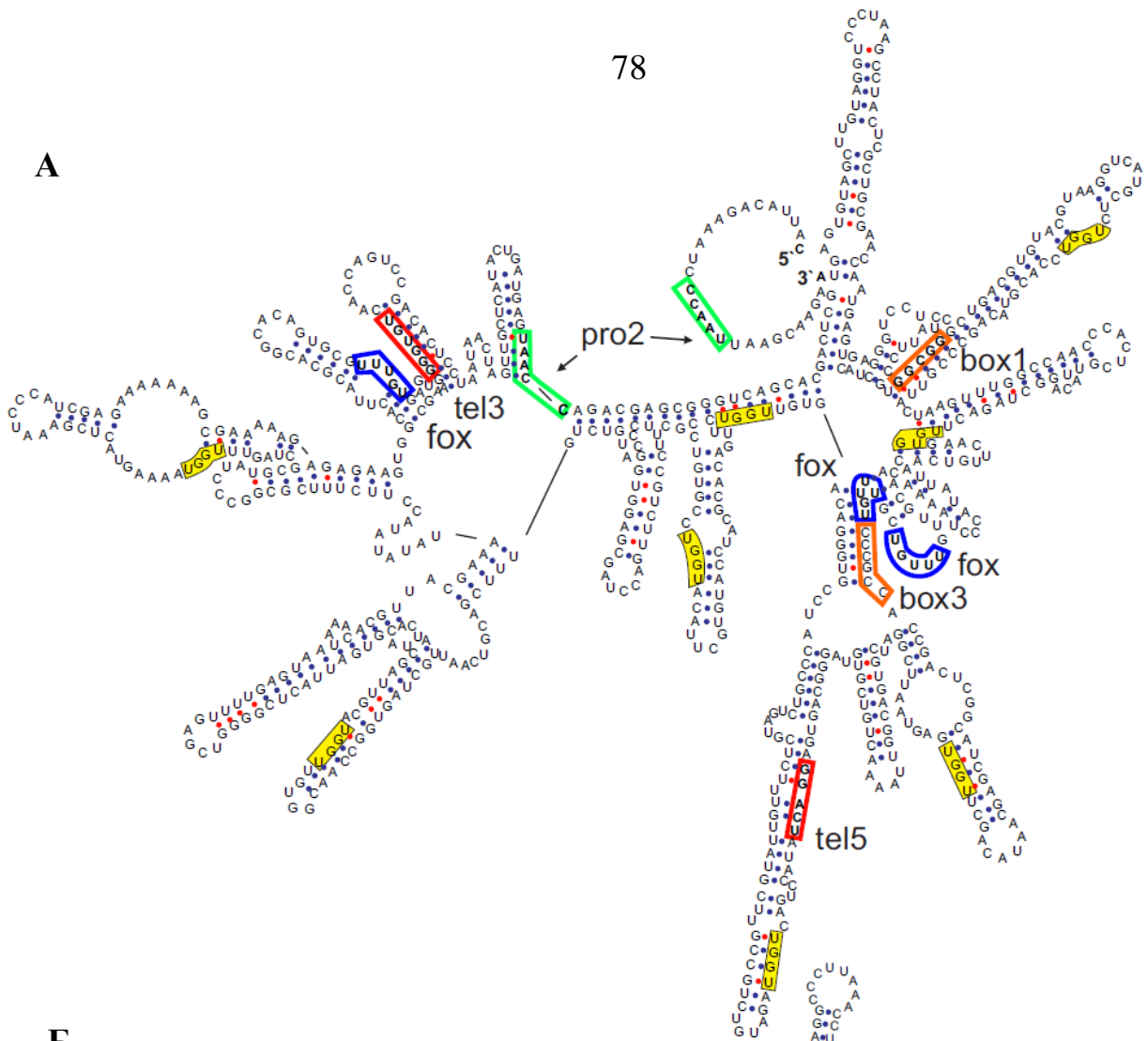
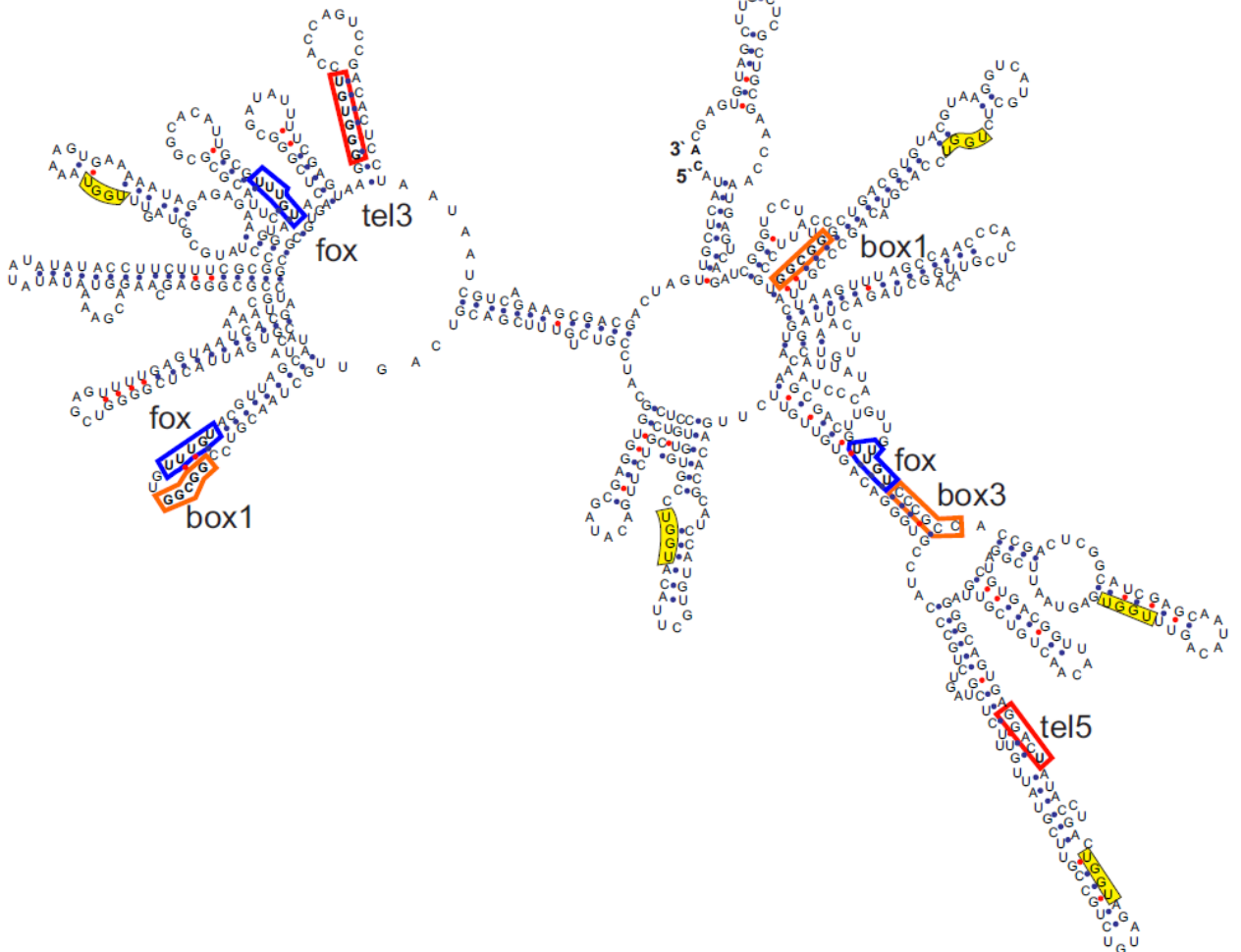


Рисунок 15. Вторичные структуры ITS1, смоделированные *de novo* в программе RNAalifold: для *N. schikhobalowi*, с минимальной свободной энергией -276,30 ккал/моль (А); для *N. salmincola*, с минимальной свободной энергией -264,20 ккал/моль (Б). Для *N. japonensis*, с минимальной свободной энергией -283,30 ккал/моль (В). Межвидовые замены между *N. salmincola* и *N. schikhobalowi* обведены кружками, внутривидовые находятся в квадратах. Межвидовые замены между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* находятся в квадратах. Межвидовые замены между представителями *N. japonensis* и *N. salmincola* обведены кружками. Внутривидовые переменные нуклеотиды – в ромбах. Вставки окрашены в серый цвет, делеции маркированы треугольниками. Канонические связи между нуклеотидами обозначены синей точкой, неканонические – красной.

A



B



апекса домена С. Аналогичная петля, смещенная в апекс домена С, присутствовала на вторичных структурах *N. salmincola*. DG, необходимая для образования вторичных структур в RNAalifold, варьировала от -101,7 до -101,8 ккал/моль соответственно для *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*. DG, генерированная RNAalifold для структуры ITS2 *N. japonensis*, отмечалась на уровне -102,30 ккал/моль. Для всех нанофиетусов было характерно следующее распределение замен: одна локализовалась в домене А, две или три в С и две в D. Распределение регуляторных и теломерных мотивов также оказалось идентичным, за исключением дополнительного fox мотива у *N. schikhobalowi*.

На вторичных структурах ITS1 и ITS2 нанофиетусов были локализованы общие для эукариот 5`-UGGU-3` (Schultz et al., 2005; Ghatani et al., 2012; Coleman et al., 2015) и специфичные для трематод 5`-GAGUCGUGGCUCA-3`; 5`-GGGUGCCAGAUC-3` (Morgan, Blair, 19986) консервативные мотивы. Последовательность UGGU в ITS1 повторяется по 8 раз у *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, и только 5 раз у *N. salmincola* (Рисунок 16), а в ITS2 – 3 раза у всех трех видов (Рисунок 17). Мотивы GAGUCGUGGCUCA и GGGUGCCAGAUC встречаются единожды только в ITS2, причем в случае со вторым мотивом – GGGUGCCAGA(U)C происходит замена последнего урацила на аденин (Рисунок 17).

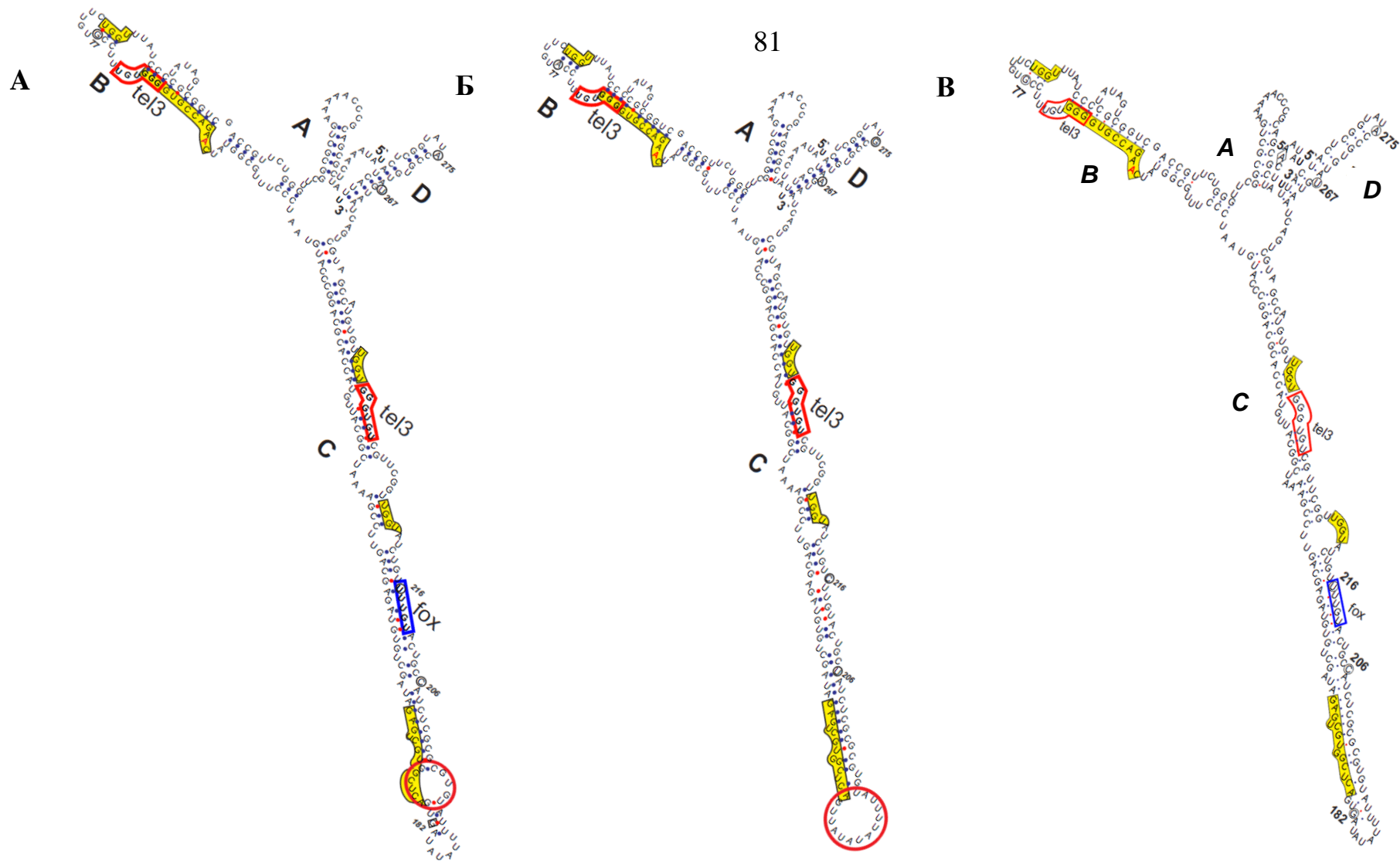


Рисунок 17. Вторичные структуры ITS2, смоделированные *de novo* в RNAalifold, с нанесенными на них специфичными, теломерными и регуляторными мотивами (в цвете, см. подпись к рисунку 16): для *N. schikhobalowi*, с минимальной свободной энергией -101,70 ккал/моль (А); для *N. salmincola*, с минимальной свободной энергией -101,80 ккал/моль (Б); для *N. japonensis*, с минимальной свободной энергией -102,30 ккал/моль (В). Межвидовые замены обведены кружками, внутривидовые находятся в квадратах.

3.1.3. Вторичные структуры переменных участков 18S рРНК

Основываясь на графике энтропии, наглядно демонстрирующем мутационный профиль 18S рДНК (Рисунок 18), были смоделированы вторичные структуры пяти наиболее переменных доменов ($ES3^S$, $ES6^S$, $ES7^S$, $ES9^S$, $ES12^S$) и четырех присоединенных к ним спиралей (h26, h39, h44) 18S рРНК для 45 видов 14 семейств (включая Troglotrematidae) трематод отряда Plagiorchiida.

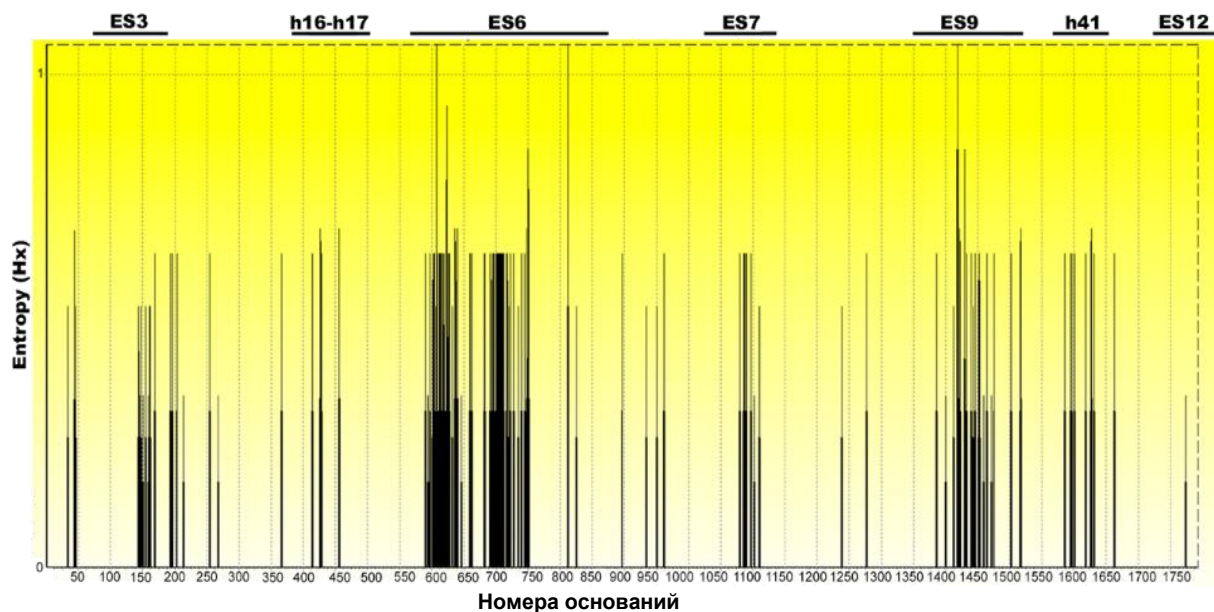


Рисунок 18. График энтропии полноразмерных выровненных последовательностей гена 18S рРНК (~1800 п.н.) 25 видов *Digenea*, демонстрирующий изменчивость в определенной нуклеотидной позиции.

В Таблице 13 представлена краткая характеристика переменных участков. Их длина у анализируемых видов варьирует в широких пределах: от 41 (h26- $ES7^S$) до 330 п.н. ($ES6^S$). Однако длина переменных спиралей находится либо в узком диапазоне (максимум 19 п.н.) значений, либо постоянна (h26- $ES7^S$ и h44- $ES12^S$). Минимальная доля спиральных участков составляла около 40% ($ES3^S$), а максимальная — 85% ($ES9^S$). GC-содержание различалось в зависимости от исследуемого вида и домена, и в целом варьировало от 37% до 67%, причем изменчивость в спиральных участках была выше, чем в петлях: 29% ($ES12^S$) — 88% ($ES7^S$) и 38% ($ES12^S$) — 55% ($ES6^S$) соответственно. Нуклеотидные отличия ESs между двумя разными видами составляли 0,2 — 36%. Уровень мутационной

изменчивости разных ESs широко варьировал; по разным критериям наиболее изменчивыми были ES6^S и h39-ES9^S (Таблица 6).

Таблица 6. Некоторые характеристики ES внутри и между семействами Digenea

Вариабельный участок	Длина п.н.	GC _{AV} %	Петли/Спирали отношение	Число замен м/у двумя видами (%)	Число моделей	Отношение замещений	
						Nv: Nc	Nv: Nt
ES3 ^S	101 - 112	39 - 53	1,47	0,7 - 7	3	0,38	3,65
ES6 ^S	311 - 327	48	0,28	0,2 - 5	15	0,36	14,23
h39-ES9 ^S	115 - 119	59	0,16	0,5 - 36	10	1,46	5,59
h26-ES7 ^S	41	67	0,25 - 0,7	0 - 5	4	0,39	4,99
h44-ES12 ^S	105	41	0,29	0 - 3	2	0,33	3,16
h16	35	49	1,5	2	1	0,25	0,85
h17	36	37	1	0,8	1	0,09	0,36
h41	63 - 64	50	0,34 - 0,75	2 - 4	6	0,29	1,70

Nv – общее количество вариабельных сайтов в каждом домене, Nc – общее количество консервативных сайтов в каждом домене и Nt – общее число вариабельных сайтов во всех доменах (Ki, 2012).

Структура ES3^S имеет сложную конформацию, состоит из двух шпилек, ES3a и ES3c, и спирали ES3b, соединяющей крупную внутреннюю петлю и ES3c с остальной частью молекулы. Были выделены три варианта укладки данного участка (Рисунок 19). Первый характерен для большинства исследуемых семейств, второй – только для семейства Notocotylidae, а третий вариант является общим для Troglotrematidae и Paragonimidae. Основные отличия внутри этих моделей заключались в наличии или отсутствии внутренних петель в шпильках ES3a и ES3c, размере (23 – 28 п.н.) и расположении центральной внутренней петли, особенно у представителей семейства Notocotylidae, у которых она выпуклая, ассиметрична и смещена вправо. Большинство различий между семействами (19%) сосредоточены в теле шпильки ES3c. Внутриродовая изменчивость троглотрематид и нотокотилид по ES3^S составила 1 и 7% соответственно.

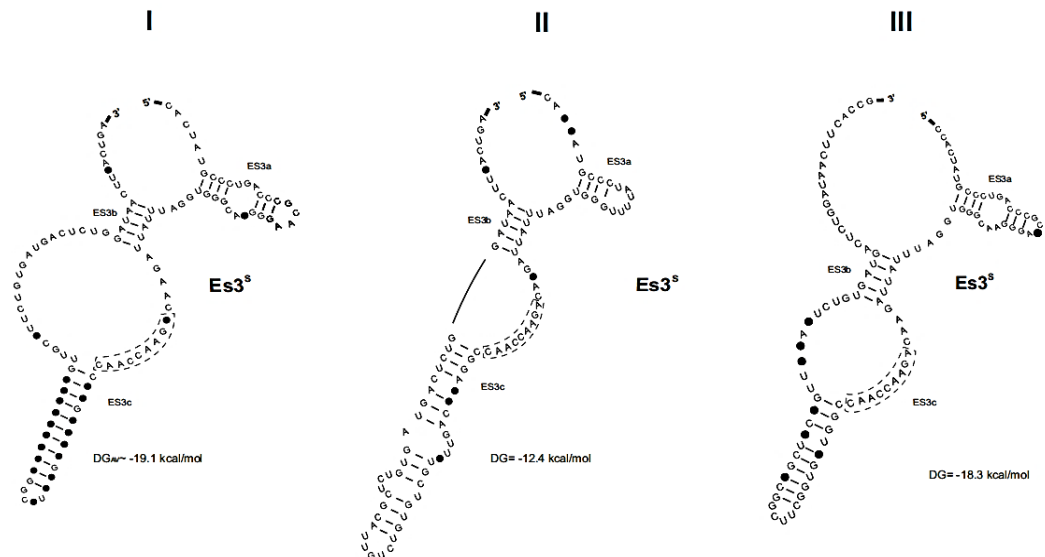
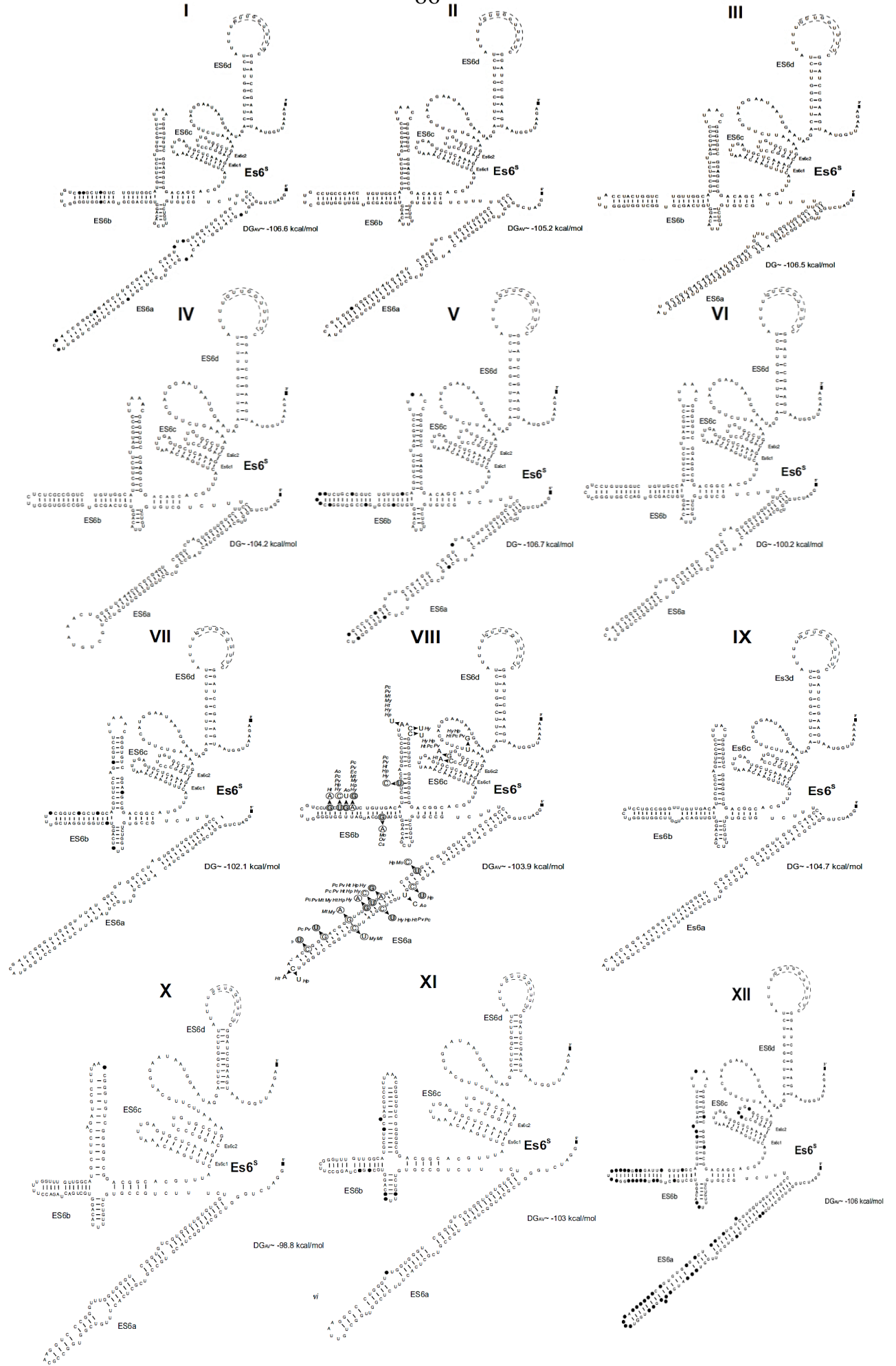


Рисунок 19. Модели ES3^S, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Сайт взаимодействия ES3^S находится в пунктирной рамке. Замены обозначены черными точками. I – Fasciolodae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*; Echinostomatidae: *Euparyphium melis*, *Drepanocephalus spathans*; Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; Echinochasmidae: *Echinochasmus japonicus* E. *milvi*; Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*; Opisthorchiidae: *Metorchis orientalis*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*; Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai*, *H. pumilio*, *Metagonimus takahashii*, *M. yokogawai*; II – Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*, *N. pacifera*; III – Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermani*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*.

В состав самого обширного домена ES6^S входит 5 вариабельных шпилек (субдоменов): ES6a, ES6b, ES6c1, ES6c2, ES6d. На 5'-конце (структуры ES6a и ES6b) домен имеет значительную нуклеотидную изменчивость, в то время как на 3'-конце (структуры ES6c1, ES6c2 и ES6d) он достаточно консервативный. У разных видов дигеней субдомены имеют единый план строения, но конформационно отличаются друг от друга наличием внутренних и выпуклых петель внутри тела шпилек и различным числом нуклеотидов, входящих в состав булавочных головок. Эти структурные особенности являются уникальной чертой того или иного семейства. Для подтверждения выводов по данному домену в анализ дополнительно были включены 20 нуклеотидных последовательностей разных видов трематод из четырех семейств: *Haploporidae*, *Allocreadiidae*, *Encyclometridae* и *Haplospalchnidae*. В целом выявлено 15 вариантов укладки

домена ES6^S (Рисунок 20). Только для семейства Echinostomatidae было получено два варианта укладки, с отличиями по ES6a (Рисунок 20, II, III). В обоих вариантах ES6a для *Drepanocephalus spathans* и *Euparyphium melis*, вместе с *Isthmiophora hortensis* содержатся по три петли, отличающиеся размером, т.е. количеством образующих их нуклеотидов. У *Drepanocephalus spathans*, помимо сходных однонуклеотидных выпуклых петель, внутренние петли в целом были крупнее. Остальные модели вторичных структур представлены согласно принципу – один вариант укладки на одно семейство: Fasciolidae, Philophthalmidae, Echinochasmidae, Psilostomatidae, Notocotylidae, Troglotrematidae, Paragonimidae, Naplororidae, Allocreadiidae, Naplosplanchnidae, за исключением представителей семейств Heterophyidae и Opisthorchiidae, имеющих общий вариант укладки (Рисунок 20, VIII), и *Stellantchasmus falcatus* (Heterophyidae), представляющего отдельную структуру ES6^S (Рисунок 20, IX).

ES6a исследованных видов имеет вид простых шпилек, в состав которых в среднем входило 87 п.н.; большинство замен как внутри, так и между семействами рассредоточено по всей длине шпильки. Крупную булавоочную головку на конце шпильки имеет только *Philophthalmus gralli*, что выделяет его по сравнению с остальными представителями дигеней. В центре ES6b (средний размер 115 п.н.) находится множественная петля, от которой отходят три шпильки разной длины, образуя крестообразную структуру. Этот субдомен характеризует внутриродовую изменчивость *Echinochasmus* и *Notocotylus* (Рисунок 20, V, VII). Субдомены ES6c имеют вид шпилек разной длины (26 и 17 п.н.). Внутри ES6c2 локализовано две замены при сравнении семейств Heterophyidae и Opisthorchiidae (Рисунок 20, VIII) и три замены внутри семейства Naplororidae (Рисунок 20, XII). ES6d оказался наиболее консервативным; у всех семейств в его состав стабильно входило 36 нуклеотидов и отсутствовала какая-либо изменчивость. Процент нуклеотидных различий ES6^S внутри семейств варьирует от 0,3 у Echinostomatidae до 18% у Naplororidae. Внутриродовая изменчивость эхинохазмид, нотокотилид и троглотрематид составила 5,2 и 0,3% соответственно.



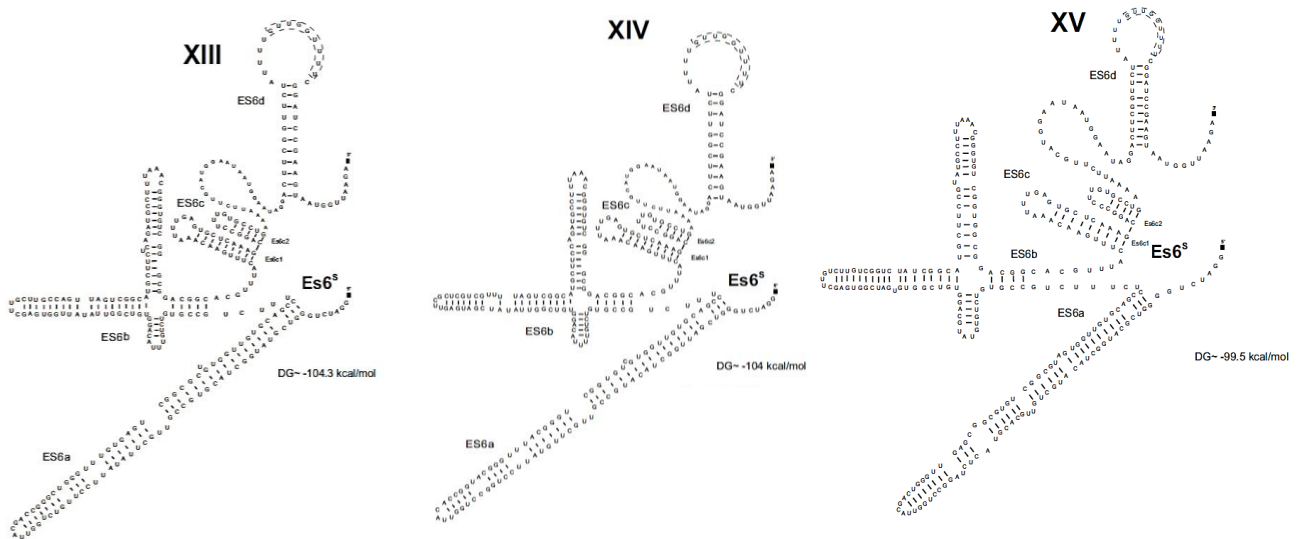


Рисунок 20. Модели ES6^S, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Дополнительные виды, включенные в анализ, отмечены звездочками (описание в тексте). Компенсаторные (CBCs) (в белых кругах) и полу-компенсаторные hemi-CBC (в серых кругах) замены показаны на примере структуры № VIII для Opisthorchiidae и Heterophyidae. Сайт взаимодействия ES6S находится в пунктирной рамке. Замены обозначены черными точками. I – Fasciolodae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*; II – Echinostomatidae: *Euparyphium melis*, **Isthmiophora hortensis*; III – Echinostomatidae: *Drepanocephalus spathans*; IV – Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; V – Echinochasmidae: *Echinochasmus japonicus*, *E. milvi*; VI – Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*; VII – Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*, *N. pacifera*; VIII – Opisthorchiidae: *Metorchis orientalis* (Mo), *Opisthorchis viverrini* (Ov), **Clonorchis sinensis* (Cs); Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai* (Hy), *H. pumilio* (Hp), **H. taichui* (Ht), *Metagonimus takahashii* (Mt), *M. yokogawai* (My), **Procerovum varium* (Pv), **P. cheni* (Pc), **Amphimerus ovaliss* (Ao), **Euryhelmsis costaricensis* (Ec); IX – Heterophyidae: **Stellantchasmus falcatus*; X – Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; XI – Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermanni*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*; XII – Haploporidae: **Forticulcita gibsoni*, **Dicrogaster contracta*, **D. perpusilla*, **Ragaia lizae*, **Haploporus benedeni*, **Lecithobotrys putrescens*, **Saccocoelium obesum*, **S. brayi*, **S. cephalic*, **S. tensum*; XIII – Allocreadiidae: **Crepidostomum cooperi*; XIV – Encyclometridae: **Polylekithum ictaluri*; XV – Haplospalchnidae: **Haplospalchnus pachysomus*.

ES7^S – переменный участок с наименьшим размером – 21 п.н.; характеризуется достаточно высокой степенью нуклеотидной изменчивости между семействами дигеней – до 32%; большинство замен локализовано в

шпильке (Рисунок 21). Спираль 26, соединенная с ES7^S, содержит фиксированное число нуклеотидов – 20; внутри h26 неизменно локализуется одна внутренняя петля. Выявлено 4 варианта укладки домена ES7^S-h26. В ES7^S большинства семейств размер булавочной головки сокращен до трех нуклеотидов (Рисунок 21, I), в то время как у представителей Echinostomatidae и Philophthalmidae, Notocotylidae, и Troglotrematidae она довольно крупная и варьирует по размеру: 9, 12 и 13 п.н., соответственно (Рисунок 21, II – IV).

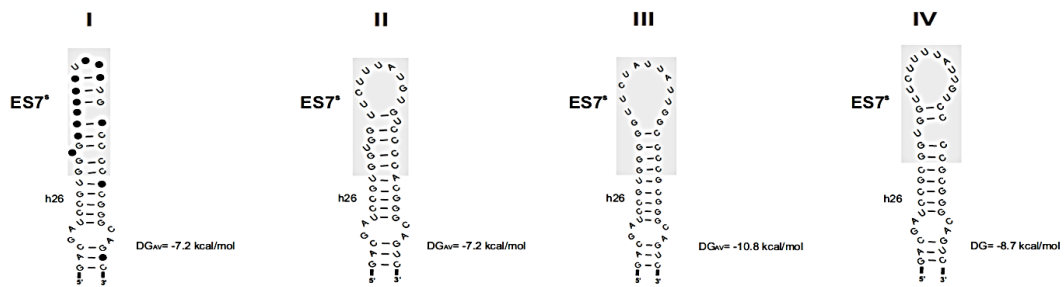


Рисунок 21. Модели h26-ES7^S, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Варибельный домен ES7^S на сером фоне. Замены обозначены черными точками. I – Fasciolodae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*; Echinostomatidae: *Euparyphium melis*; Echinohasmidae: *Echinochasmus japonicus*, *E. milvi*; Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*; Opisthorchiidae: *Metorchis orientalis*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*; Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai*, *H. pumilio*, *Metagonimus takahashii*, *M. yokogawai*; II – Echinostomatidae: *Drepanocephalus spathans*; Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; III – Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*, *N. pacifera*; IV – Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermani*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*.

ES9^S имеют длину около 70 п.н. и стабильно отделяются от h39 внутренней петлей из четырех или восьми нуклеотидов (Рисунок 22). Конформация h39 остается неизменной у всех дигеней; 10 нуклеотидов с начала и конца домена h39-ES9^S строго консервативны, а большинство нуклеотидных замен, как внутриродовых, так и между представителями различных семейств сконцентрированы в шпильке ES9^S. Всего на h39-ES9^S приходится от 3 до 6 внутренних петель, 1 – 2 выпуклых петли и 2 – 3 однонуклеотидных выпуклых петли. Было получено 10 вариантов укладки вторичных структур h39-ES9^S

(Рисунок 22). Из них два с неявно выраженными различиями приходилось на семейство Echinostomatidae: первый вариант характерен для *Euraryphium melis* (Рисунок 22, II), а второй – для *Drepanocephalus spathans* (Рисунок 22, III). В структуре *Euraryphium melis* дополнительно содержится по паре спаренных нуклеотидов (A-U и G-U) с локализацией в h39 и апексе ES9^S.

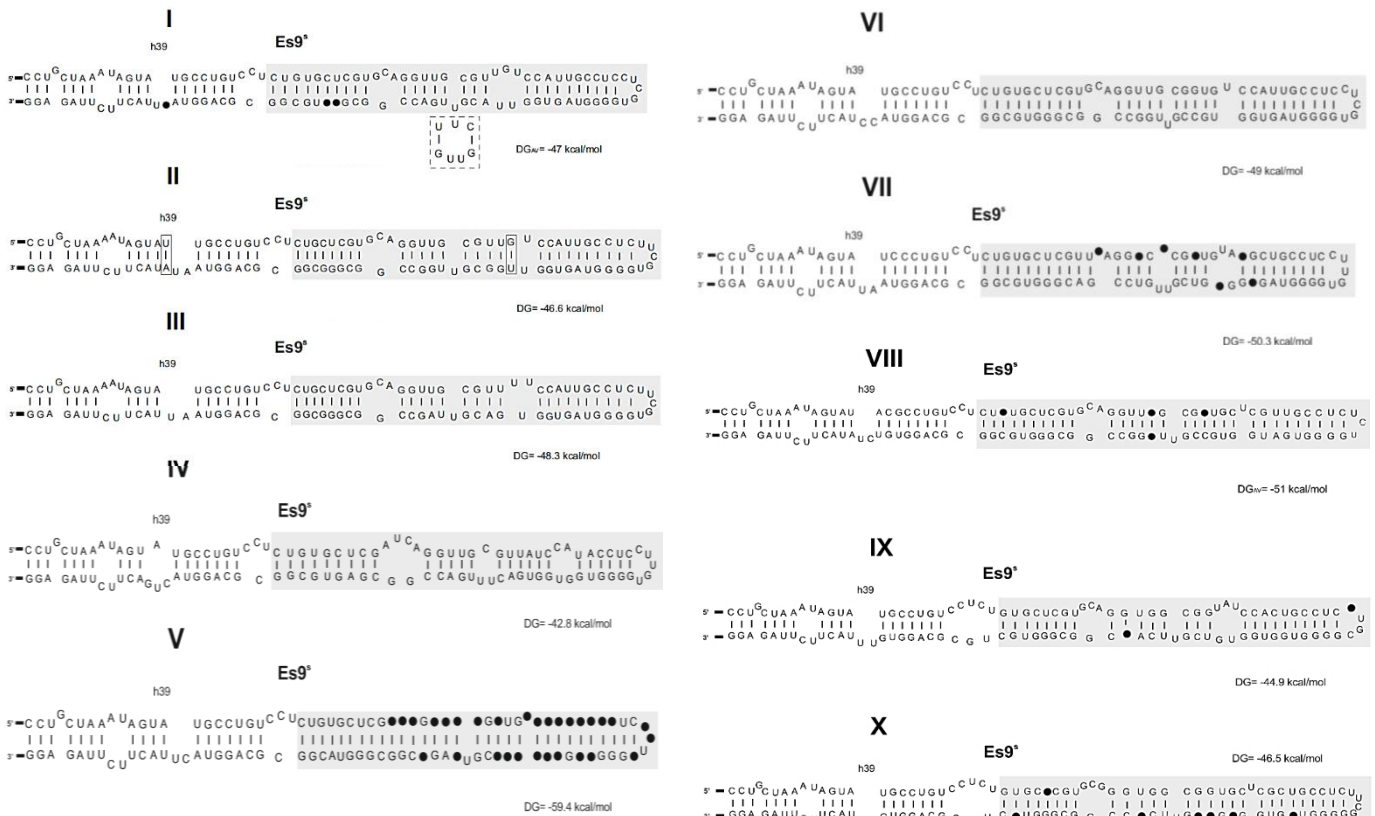


Рисунок 22. Модели ES9^S, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Вариабельный домен ES9^S на сером фоне. Замены обозначены черными точками. I – Fasciolidae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*; II – Echinostomatidae: *Euraryphium melis*; III – Echinostomatidae: *Drepanocephalus spathans*; IV – Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; V – Echinoasmatidae: *Echinochasmus japonicus*, *E. milvi*; VI – Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*; VII – Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*; *N. pacifera*; VIII – Opisthorchiidae: *Metorchis orientalis*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*; Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai*, *H. pumilio*, *Metagonimus takahashii*, *M. yokogawai*; IX – Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; X – Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermani*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*.

ES12^S является наиболее консервативным участком: образован примерно 40 нуклеотидами и соединяется со спиралью h44. Конформация h44 сходна для всех исследуемых трематод, включает 3 внутренних петли, и через последнюю переходит в шпильку ES12^S. Выявлено 2 варианта укладки вторичных структур домена h44-ES12^S (Рисунок 23). У большинства видов ES12^S имеет вид шпильки с двумя внутренними петлями, однонуклеотидной выпуклой и внутренней из трех нуклеотидов. Исключение составляет *S. monorchis*, у которого ES12^S несет две одинаковых однонуклеотидных выпуклых петли. Большинство нуклеотидных замен, отличающих виды 9 семейств дигеней сосредоточены в апексе ES12^S (20 из 26 п.н.). Внутриродовых различий обнаружено не было.

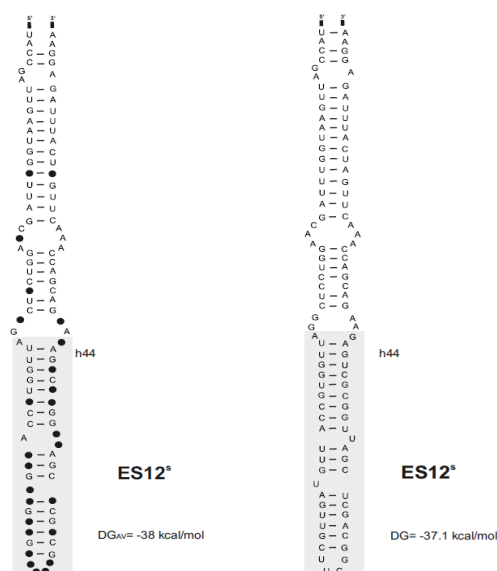


Рисунок 23. Модели ES12^S, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Вариабельный домен ES12^S на сером фоне. Замены обозначены черными точками. Fasciolodae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*; Echinostomatidae: *Euparyphium melis*; Echinostomatidae: *Drepanocephalus spathans*; Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; Echinohasmidae: *Echinochasmus japonicus*, *E. milvi*; Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*; *N. pacifera*; Opisthorchiidae: *Metorchis orientalis*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*; Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai*, *H. pumilio*, *Metagonimus takahashii*, *M. yokogawai*; Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermani*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*. II – Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*.

Следует отметить, что домены гораздо более изменчивы по сравнению со спиральями (Таблица 6), поэтому между спиральями, за исключением h41, существенных отличий не обнаружено. Длина переменных участков варьировала от 35 (h16) до 64 п.н. (h41); доля спиральных участков составляла от 28% (h17) до 75% (h41). Общий GC-состав составлял около 40%, а содержание GC в спиральях варьировало от 30 – 60%, а в петлях было в пределах 25 – 40%. Нуклеотидная изменчивость спиральных участков между парами видов составила 0,8 – 4%. Конформации вторичных структур спиралей 16 и 17 (h16 и h17) внутри исследуемых семейств одинаковы (Рисунок 24), хотя нуклеотидная изменчивость спирали h16 практически в три раза превышает таковую h17. Обе спирали заканчиваются небольшими булавочными головками; со стороны 5'-концов образуются протяженные внешние петли.

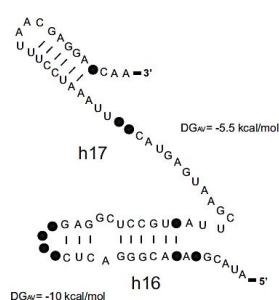


Рисунок 24. Модели h16 – h17, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Замены обозначены черными точками

Спираль h41 образована в среднем 63 нуклеотидами. Спирали отличаются друг от друга размером, конформацией и локализацией внутренних петель; всего получено 6 вариантов укладки (Рисунок 25). Число переменных нуклеотидов между семействами варьирует от 3 – 5 до 11 – 16%. Три спирали являются видо-специфичными. У *E. milvi* из-за вставки аденина в положении 27 от 5'-конца спирали структура h41 отличается наличием двух внутренних петель, расположенных через два основания друг от друга (Рисунок 25, III). У родственного вида *E. japonicus* выпуклая петля достаточно удалена от внутренней; обе петли небольших размеров, а между ними находится

однонуклеотидная выпуклая петля (Рисунок 25, II). В спирали h41 *S. monorchis*, помимо внутренней и выпуклой, локализована еще и дополнительная однонуклеотидная петля (Рисунок 25, IV). У троглотрематид в составе h41 локализуется три петли, две рядом расположенных внутренних (3 и 8 п.н.) и выпуклая петля из трех нуклеотидов (Рисунок 25, VI).

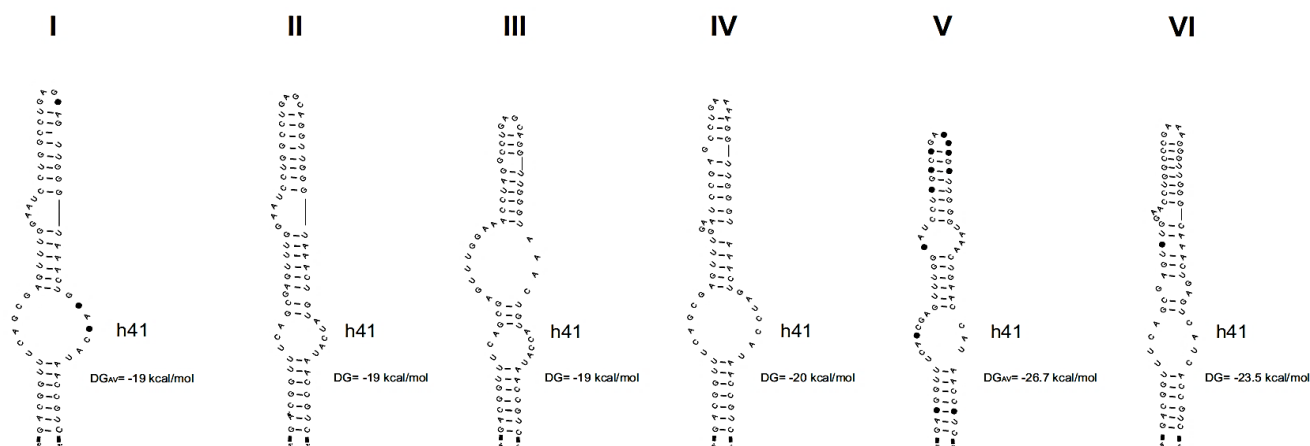


Рисунок 25. Модели h41, реконструированные *de novo* в программе Mfold. Замены обозначены черными точками. I – Fasciolidae: *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*, Echinostomatidae: *Euparyphium melis*, *Drepanocephalus spathans*, Philophthalmidae: *Philophthalmus gralli*; II – Echinohasmidae: *Echinochasmus japonicus*; III – Echinohasmidae: *Echinochasmus milvi*; IV – Psilostomatidae: *Sphaeridiotrema monorchis*; V – Notocotylidae: *Notocotylus intestinalis*, *N. pacifera*; Opisthorchiidae: *Clonorchis sinensis*, *Metorchis orientalis*, *Opisthorchis viverrini*; Heterophyidae: *Haplorchis yokogawai*, *H. pumilio*, *Metagonimus takahashii*, *M. yokogawai*; VI – Troglotrematidae: *Nanophyetus japonensis*, *N. salmincola*, *N. schikhobalowi*; Paragonimidae: *Paragonimus heterotremus*, *P. westermani*, *P. vietnamiensis*, *P. kellicotti*, *P. iloktsuenensis*.

В целом, варибельные домены 18S рРНК трематод обнаружили ряд структурных особенностей: крестообразная форма ES6b (1), наличие дополнительной укороченной спирали ES6c (2), удлиненные спирали Es6a (3) и h39+ES9^S (4). На рисунке 26 представлена предполагаемая вторичная структура 18S рРНК нанофиетусов, иллюстрирующая локализацию и структурные особенности варибельных участков трематод.

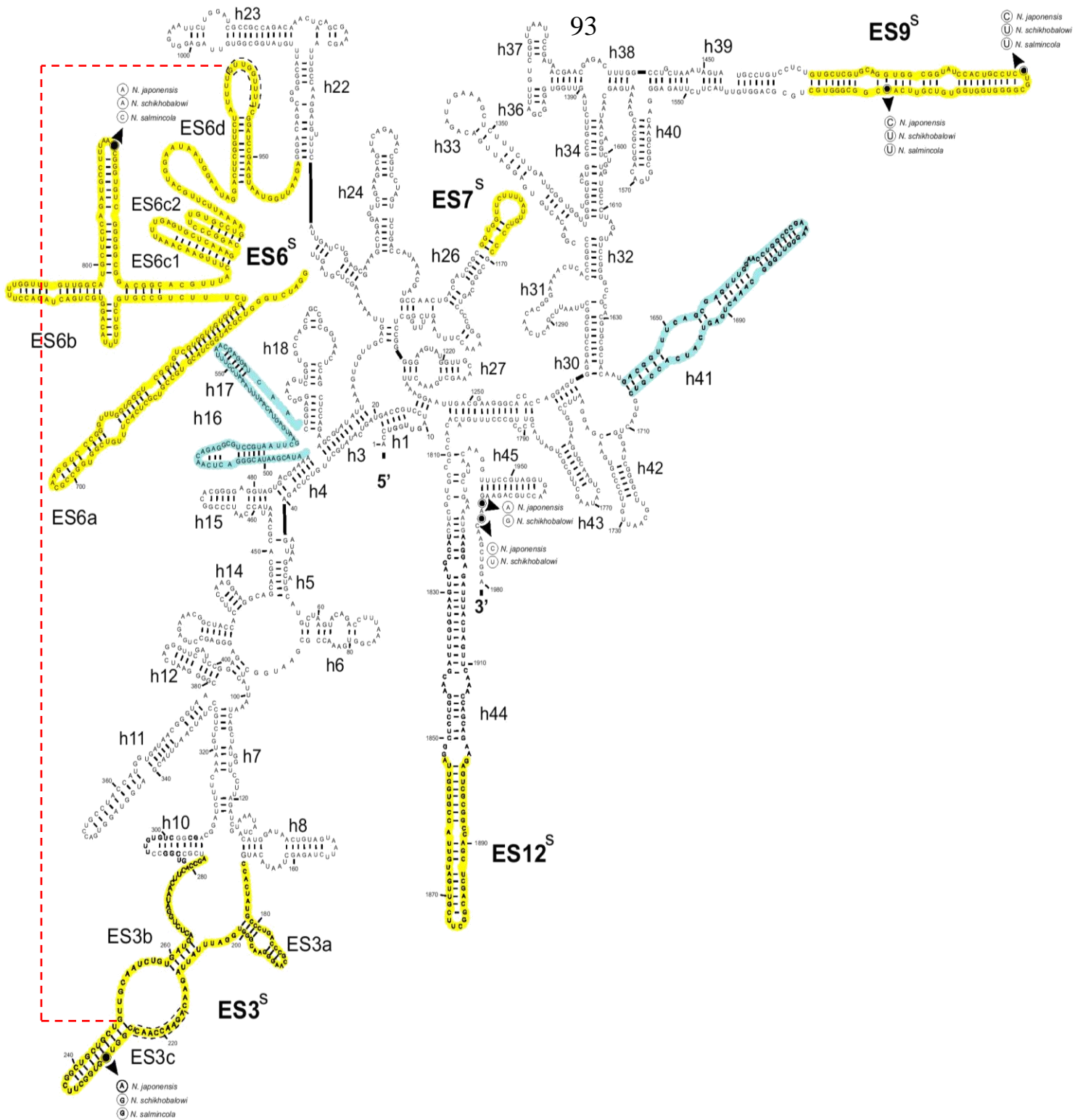


Рисунок 26. Консенсусная модель вторичной структуры малой рибосомной субъединицы 18S рРНК для видов рода *Nanophyetus*. В качестве реферной использована модель вторичной структуры 18S рРНК пшеницы *Triticum aestivum* (Armache et al., 2010). Реконструированные *de novo* переменные домены и спирали окрашены в желтый и голубой цвета соответственно. Нуклеотидные замены в последовательностях *N. schikhobalowi*, *N. salmincola* и *N. japonensis* обведены кружками. Сайты взаимодействия ES3^S-ES6^S находятся в пунктирной рамке и соединены красной пунктирной линией.

3.1.4. Филогенетические связи трематод

3.1.4.1. Внутривидовая филогения

На филогенетическом древе, построенном по последовательностям гена 18S рРНК (Рисунок 27А), четко разделяются представители семейства Troglotrematidae (клада I), включающего *Nanophyetus* spp. с *Nephrotrema truncatum*, и семейства Paragonimidae (клада II), представленного видами рода *Paragonimus*. Внутри клады I наблюдалась высокая дифференциация между родом *Nanophyetus* и *Nephrotrema*. Представители рода *Nanophyetus* образуют субкладу с индексом бутстреп-поддержки 100% и апостериорной вероятности 0,94 по Байесу (Рисунок 27А). Внутри этой субклады *N. japonensis* сформировал отдельную ветвь с хорошей поддержкой (91/0,81), относительно статистически поддержанных ветвей *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*.

На древе (Рисунок 27Б), построенном по полноразмерным последовательностям гена 28S рРНК (3917 п.н.), можно выделить отдельные субклады для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* с максимальным уровнем поддержки (90 – 91/1,0). Древо на основе неполных последовательностей 28S рРНК (1321 п.н.) оказалось неспособным разрешить отношения между *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, достоверно объединив их в общую ветвь, надежно дифференцированную от *N. salmincola* (Рисунок 27В).

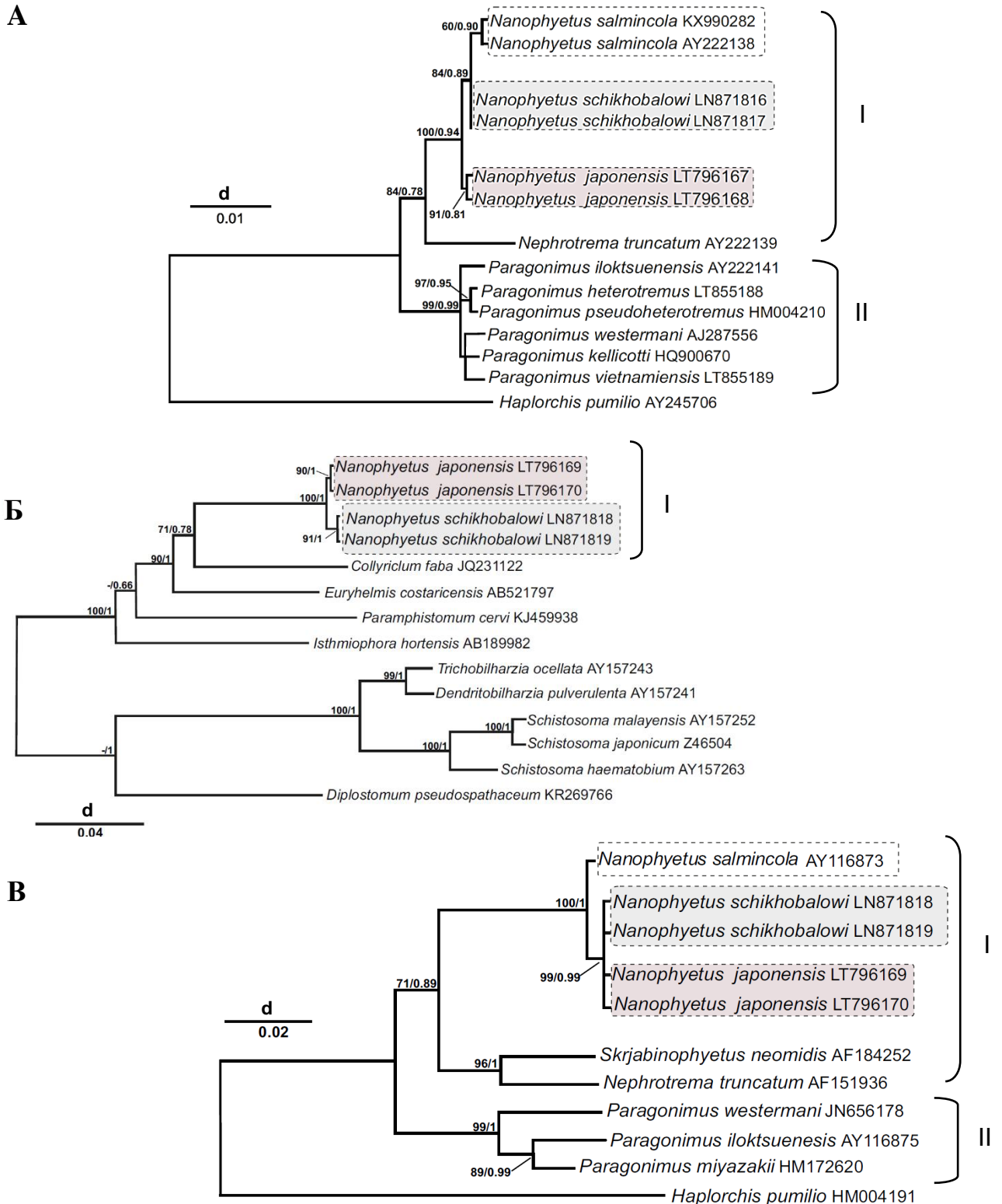


Рисунок 27. Филогенетическое древо рода *Nanophyetus*, основанное на сравнении последовательностей 18S рРНК (А); полноразмерных 28S рРНК последовательностей (Б); неполных 28S рДНК последовательностей (В). Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI).

Филогенетическое древо на основе последовательностей полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК показало разделение представителей *Nanophyetus* на две хорошо поддерживаемые (индекс бутстреп-поддержки 100; 1,0 апостериорных вероятностей по Байесу) монофилетические клады (Рисунок 28). Первая состояла из двух субклад, одна из которых объединяла особей *N. schikhobalowi* (94/1,0), другая – *N. japonensis* (100/0,97). Вторая клада включала *N. salmincola* с высоким уровнем поддержки (100/1,0).

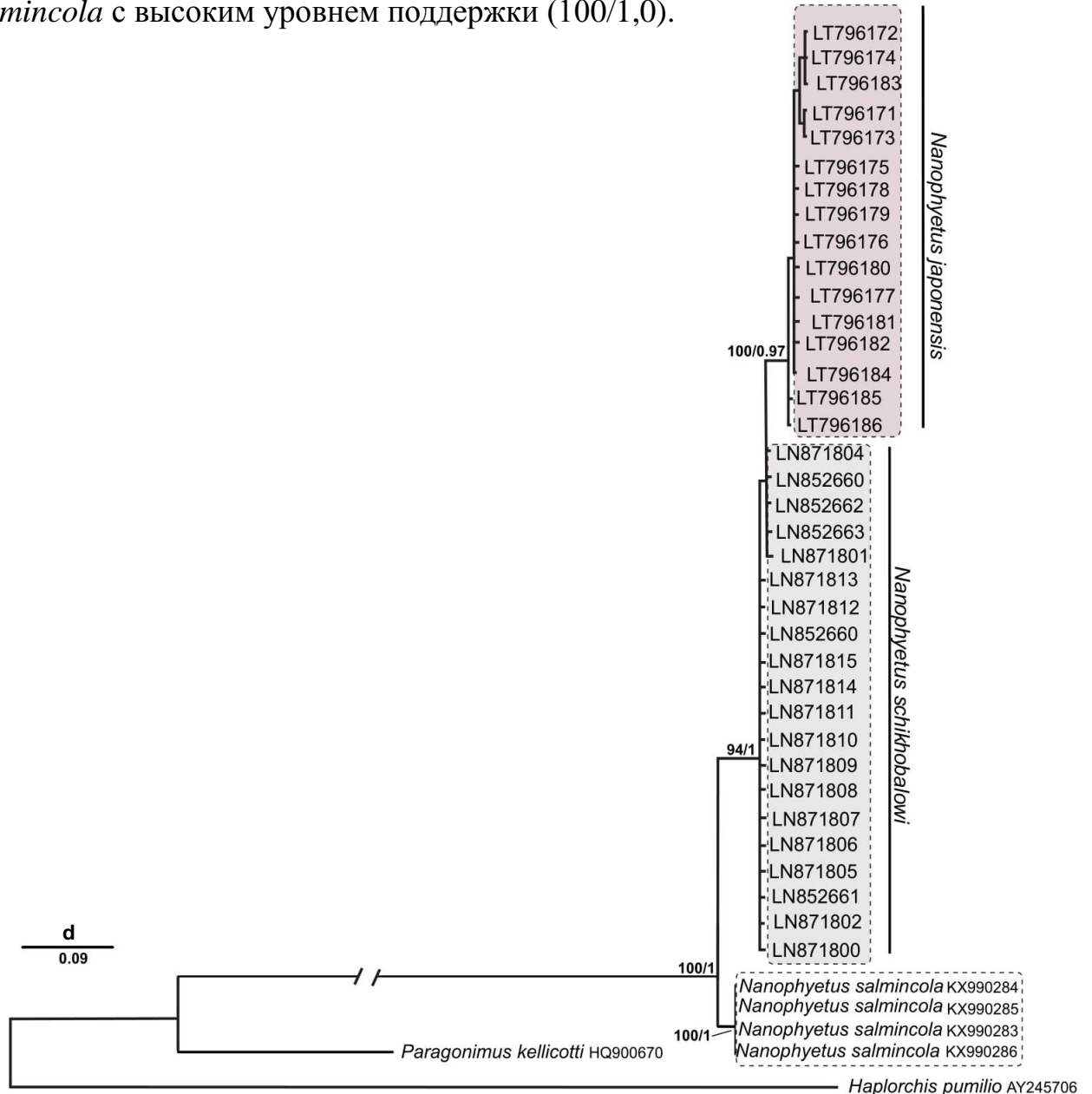


Рисунок 28. Филогенетическое древо рода *Nanophyetus*, основанное на сравнении ITS1-5,8S-ITS2 последовательностей рДНК. Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI).

3.1.4.2. Филогения подотряда Xiphidiata

С целью уточнения филогенетических связей между таксономическими группами трематод в составе подотряда Xiphidiata впервые была проведена реконструкция их молекулярной филогении. Для этого было построено филогенетическое древо на основании сравнения 78 последовательностей почти полноразмерного гена 18S рРНК (~90% длины гена) и определено положение рода *Nanophyetus* (Рисунок 29). Монофилетичность подотряда Xiphidiata имела высокую статистическую поддержку (92% бутстреп-поддержки для ML и апостериорной вероятности 0,91 для BI). Виды каждого надсемейства, за исключением Microphalloidea, располагающегося в основании филогенетического древа, формируют самостоятельные субклады (I – IV). Последовательно дифференцирующиеся надсемейства Gorgoderoidea, Naploporoidea и Allocreadioidea можно объединить в общую кладу (65% бутстреп-поддержки для ML и апостериорной вероятности 0,87 для BI), по отношению к которой хорошо поддержанная (99%/1,0) субклада надсемейства Plagiorchioidea является сестринской.

Для разрешения филогенетических связей между семействами внутри Gorgoderoidea отдельно было построено древо на основании сравнения 28 более протяженных последовательностей гена 18S рРНК (Рисунок 30). В данном анализе монофилетичность надсемейства Gorgoderoidea имеет надежную статистическую поддержку (89%/0,98). Все семейства формируют отдельные статистически поддержанные субклады. Семейство Troglotrematidae, включающее рода *Nanophyetus* и *Nephrotrema*, кластеризуется с Paragonimidae с максимальной статистической поддержкой.

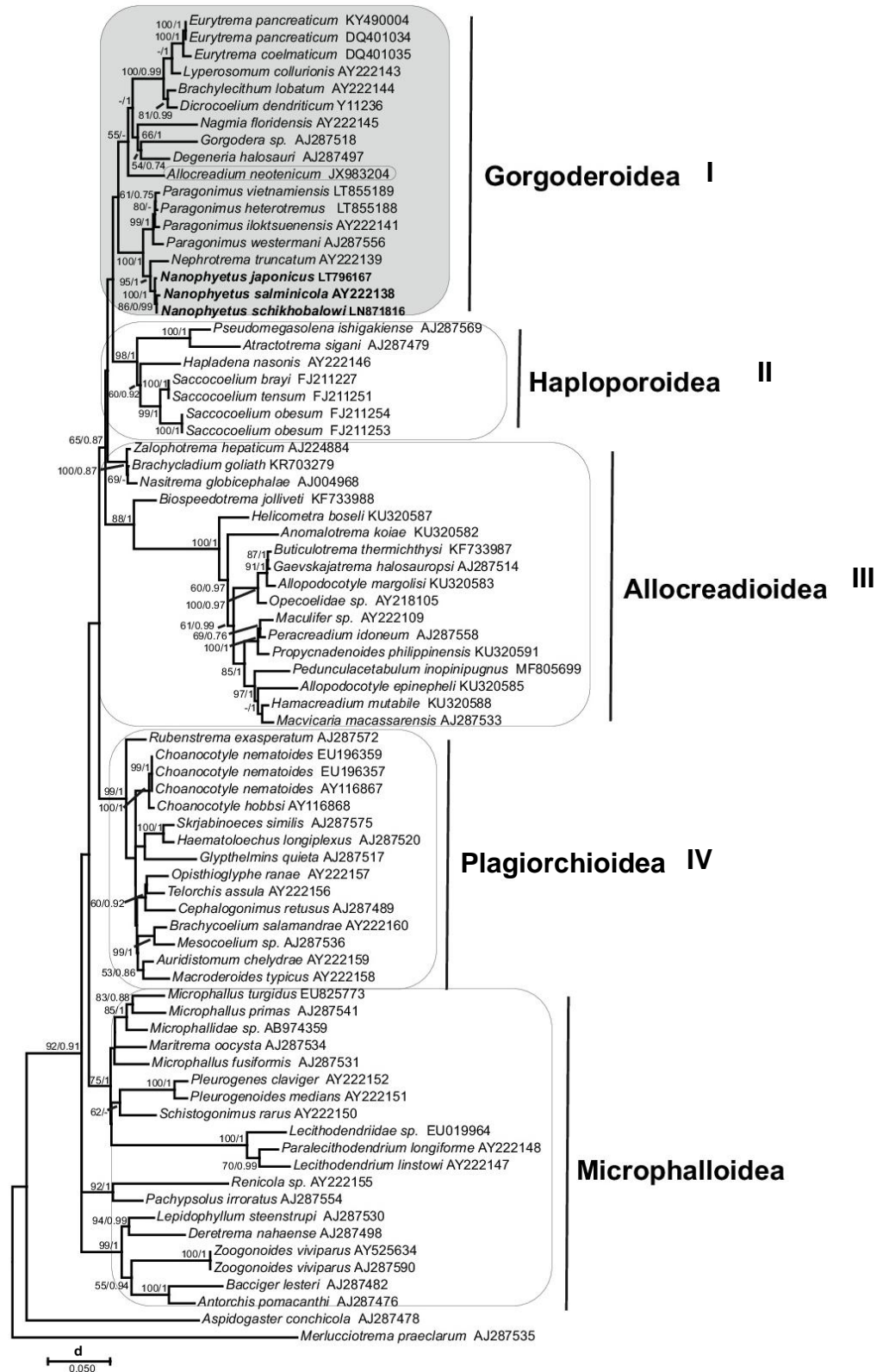


Рисунок 29. Филогенетическое древо для подотряда Xiphidiata, основанное на сравнении последовательностей гена 18S рНК трематод. *Nanophyetus spp.* выделены жирным шрифтом. Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI).

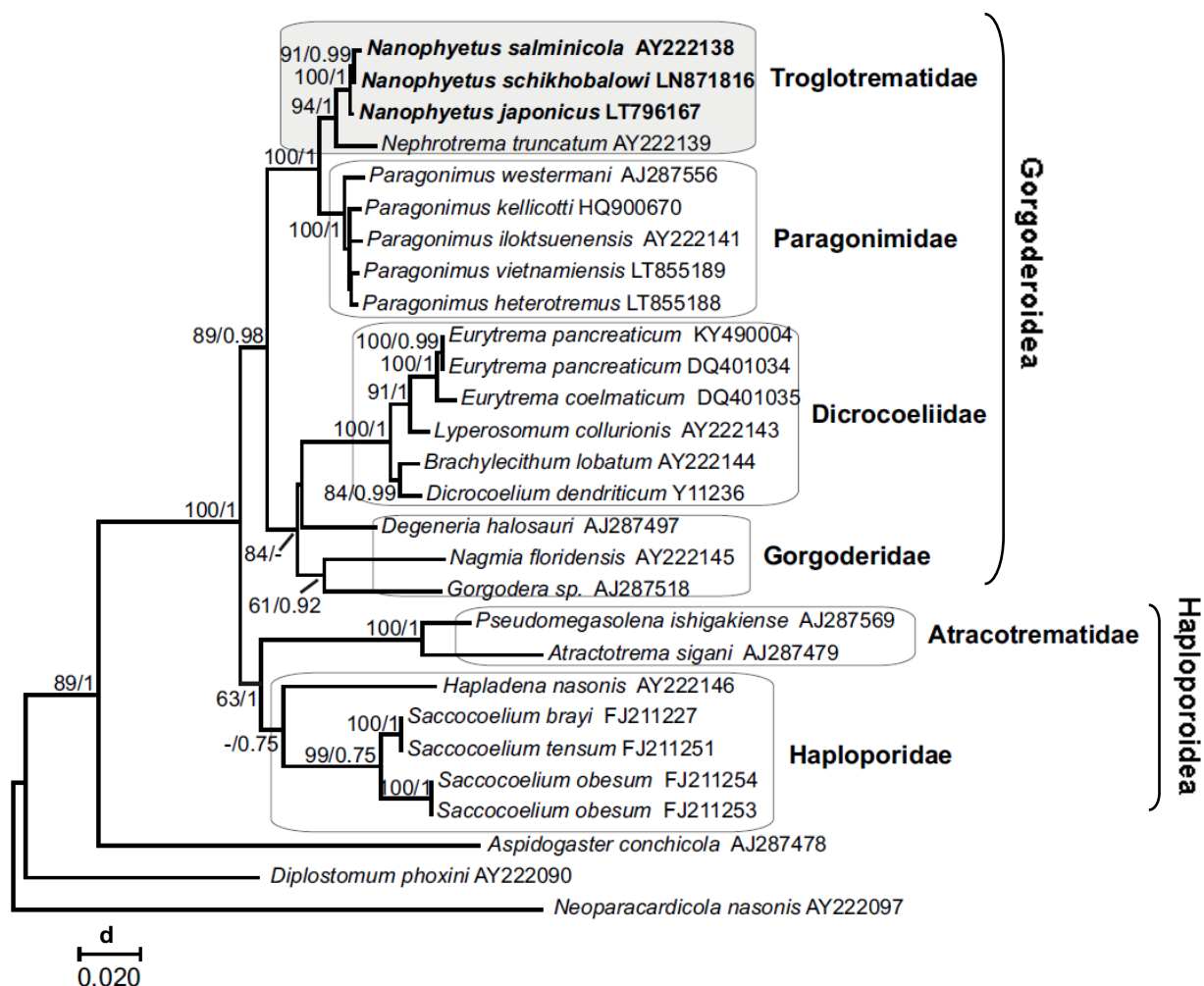


Рисунок 30. Филогенетическое древо надсемейства Gorgoderoidea, основанное на сравнении последовательностей гена 18S рРНК трематод. *Nanophyetus spp.* выделены жирным шрифтом. Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI).

3.1.4.3. Анализ филогении высокопатогенных трематод

Впервые с помощью программы BEAST произведена временная оценка дивергенции основных филогенетических линий трематод отряда Plagiorchiida (включающего *Nanophyetus spp.*). Для реконструкции филогенетического древа использовали только полноразмерные последовательности гена 18S рРНК эпидемиологически значимых видов, доступные в GenBank. Для определения экологического вектора эволюции на дендрограмме проиллюстрирована

специфичность дигенетических сосальщиков по отношению к промежуточным и окончательным хозяевам (Рисунок 31).

Древо состоит из двух статистически поддержанных клад, одна из которых включает представителей Echinostomata и Pronocephalata, другая – Xiphidiata, и Opisthorchiata. Объединение видов в клады, соответствующие подотрядам и семействам, имеет высокую поддержку; время дивергенции таксономических групп сильно отличается. Жизненные циклы в разных группах имеют выраженные специфические особенности, но между кладами можно выявить принципиальные отличия. Виды первой клады в качестве первых и вторых промежуточных хозяев используют преимущественно моллюсков, в то время как виды из второй клады, предпочитают рыб в качестве второго промежуточного хозяина.

Согласно полученным данным, плагиорхииды отделились от аспидогастрид более 100 млн.л.н., в мезозойскую эру во время раннемелового периода. Примерно 90 млн.л.н. разделились подотряды Pronocephalata и Echinostomata, а подотряды Opisthorchiata и Xiphidiata чуть позже – 70 млн.л.н. Дифференциация на семейства началась раньше внутри Echinostomata, примерно 60 млн.л.н. – в кайнозойскую эру, палеоген. Затем, уже на границе палеогена и неогена (около 25 млн.л.н.), произошло разделение на семейства внутри Opisthorchiata. Самые молодые – семейства трематод подотряда Xiphidiata, чей возраст оценивается в 10 млн. лет, неоген. Таким образом, *Nanophyetus* ssp. представляет эволюционно наиболее молодые виды патогенных трематод. На представленном древе видно, что почти каждое семейство характеризуется не только уникальностью жизненного цикла, но также уникальной моделью вторичных структур ES6^S и ES9^S, за двумя исключениями (Echinostomatidae – по две структуры ES6^S и ES9^S; Opisthorchiidae и Heterophyidae – по одной структуре ES6^S и ES9^S).

3.2. Анализ гена *nad1* мтДНК

3.2.1. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена

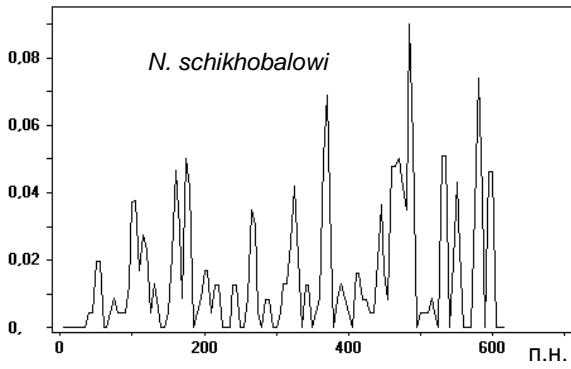
3.2.1.1. Общая характеристика

Набор данных по *nad1* включал 151 неполную последовательность длиной 621 п.н., 60 из которых были получены в данной работе (46 последовательностей *N. schikhobalowi* и 14 *N. japonensis*) и 91 последовательность *N. salmincola* (Criscione, Blouin, 2004) взяли из GenBank (Criscione, Blouin, 2004).

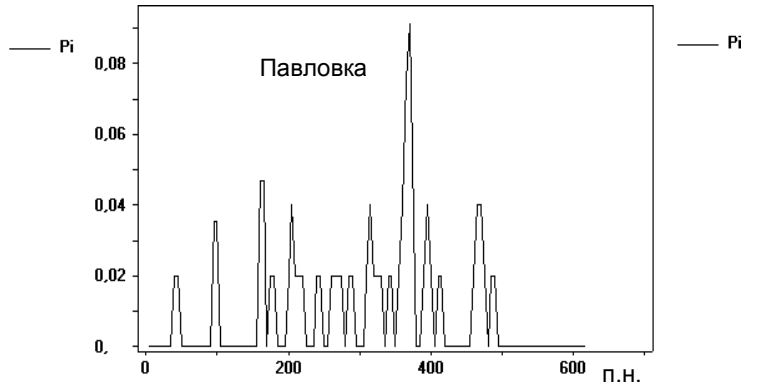
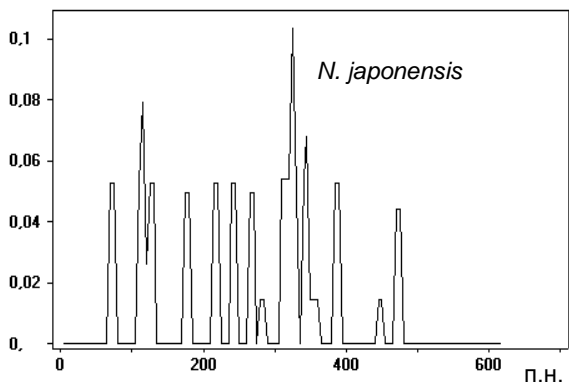
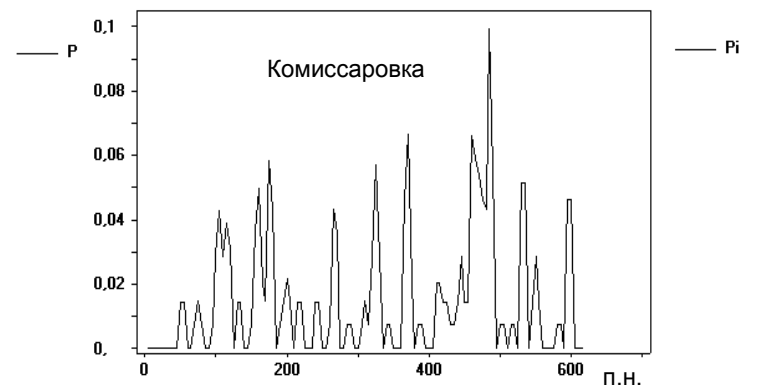
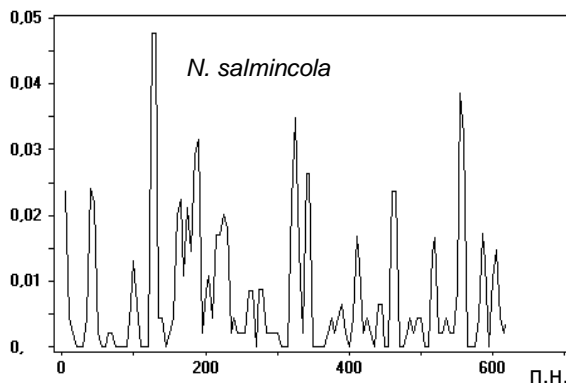
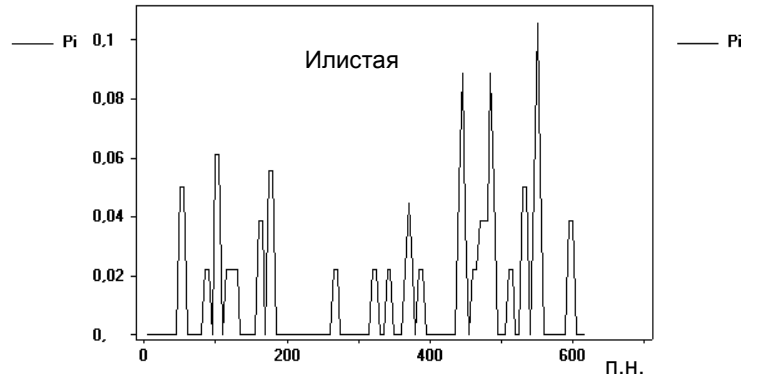
Для представителей трех географических регионов GC-содержание гена *nad1* мтДНК в среднем составляло $40,4 \pm 1,3\%$. Ген АТ-богатый, отношение АТ/GC составило 1,43; 1,44 и 1,45 у *N. schikhobalowi*, *N. salmincola* и *N. japonensis* соответственно. Большая часть мутаций представлена транзициями Т↔С – 44,4% и А↔G – 23,6%; Т↔С – 64,0% и А↔G – 34,7%; Т↔С – 50,0% и А↔G – 22,2% для *N. schikhobalowi*, *N. salmincola* и *N. japonensis* соответственно. Значения отношения Ts/Tv составили: 2,21; 10,1; 2,6 для *N. schikhobalowi*, *N. salmincola* и *N. japonensis* соответственно. Последовательности локальных популяций *N. schikhobalowi* отличались между собой по 72 нуклеотидным заменам (из которых 42 являются парсимоний-информативными). Последовательности гена *nad1* у *N. salmincola* и *N. japonensis* отличались между собой 75 (из которых 34 являются парсимоний-информативными) и 18 (14 являются парсимоний-информативными) нуклеотидными заменами соответственно.

Характер распределения нуклеотидных замен регион-специфичен: у *N. schikhobalowi* наблюдаемая изменчивость повышается по мере приближения к 3'-концу; у *N. japonensis* наиболее изменчив центральный участок, а 3'-конец консервативен; для *N. salmincola* можно выделить три участка повышенной изменчивости гена: на 3'-конце, в центре и на 5'-конце (Рисунок 32А).

А



Б



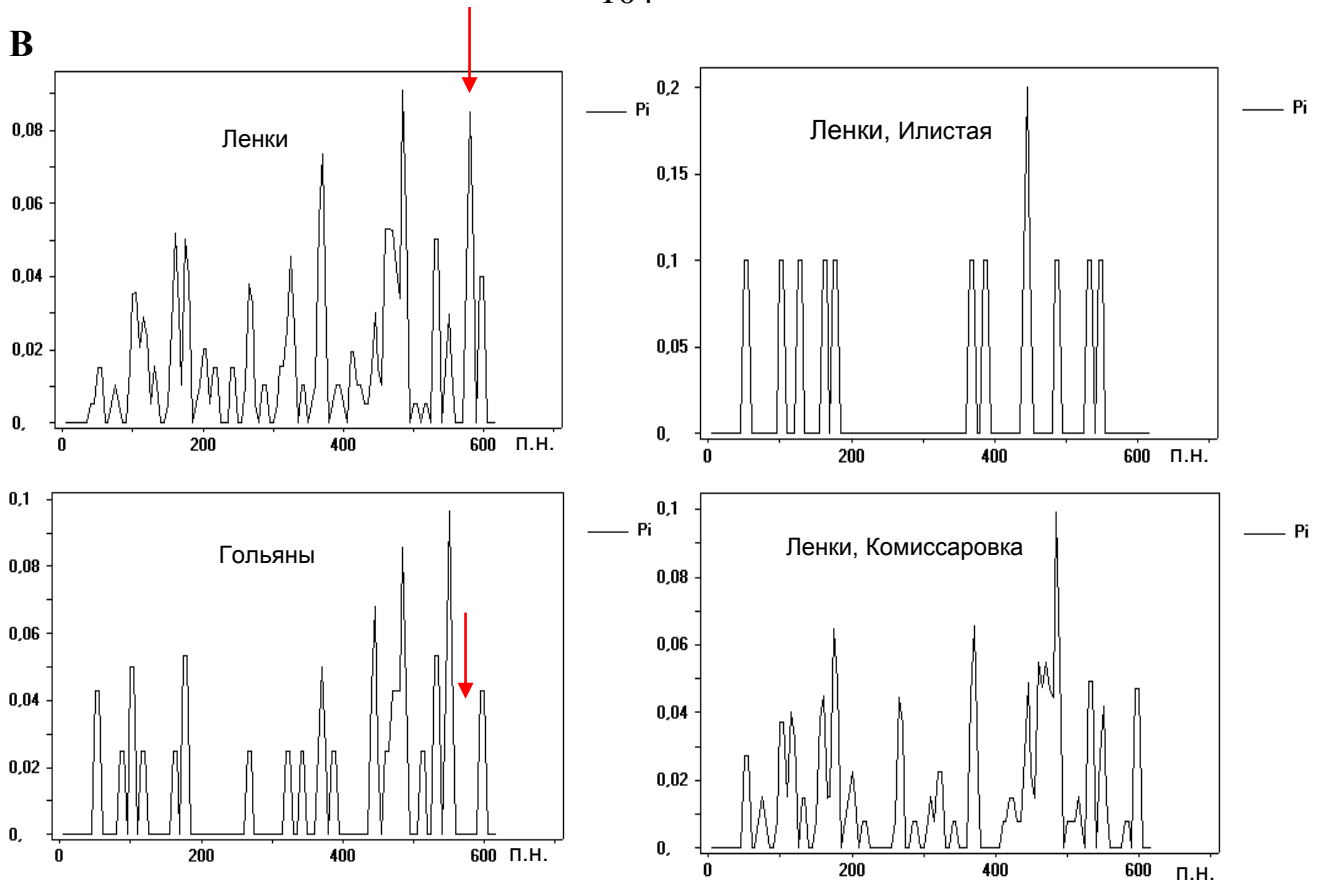


Рисунок 32. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в неполных последовательностях гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus* spp. из: различных географических регионов (А); дальневосточных локалитетов (Б); хозяев и хозяев из различных дальневосточных локалитетов (В). Стрелками указана зона, высоко изменчивая в выборке нанофиетусов из ленков, инвариабельная – в выборке из гольянов.

Нуклеотидная изменчивость *nad1* последовательностей в локальных выборках *N. schikhobalowi* (из разных рек) отличается (Рисунок 32Б). Практически во всех случаях более изменчив 3'-конец, за исключением выборки из р. Павловка, для которой, как и для *N. japonensis*, основная изменчивость сосредоточена между 300 – 400 п.н., а участок после 500 п.н. инвариабелен. Примечательно, что распределение нуклеотидной изменчивости последовательности *nad1* у особей *N. schikhobalowi*, обитающих у разных видов рыб-хозяев, также неодинаково (Рисунок 32В). Причем, для *nad1* нанофиетусов из гольянов характерны несколько инвариабельных зон от 5'- к 3'-концу, общей протяженностью примерно 200 п.н. (т.е. 1/3 размера гена). Инвариабельные зоны *nad1* нанофиетусов из гольянов соответствуют зонам пониженной изменчивости

нанофиетусов из ленков, за исключением самой ближней к 3'-концу, которая у выборки из ленков, в противоположность голянам высоко изменчива. Интересно, что именно в этой зоне (перед 600 сайтом) при сравнении нанофиетусов из ленков из разных речных бассейнов наблюдается возникновение высокого пика, означающего ярко выраженную изменчивость.

Попарные генетические расстояния внутри региональных выборок оценивались как относительно низкие: $d=0,2 - 1,4\%$ ($d_{cp}=0,8\%$), $d=0,3 - 3,2\%$ ($d_{cp}=1,6\%$) и $d=0,3 - 2,1\%$ ($d_{cp}=1,2\%$) для *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* соответственно. Среднее количество попарных отличий (k) между последовательностями, нуклеотидная изменчивость (π) и генотипическое разнообразие (Hd) в объединенной выборке ($n=151$) значительно выше: $53,075$; $0,08547 \pm 0,00383$; $0,9966 \pm 0,0017$ соответственно. Отмечены высокие значения индексов генетической изменчивости для каждого вида, хотя нуклеотидная изменчивость для *N. salmincola* несколько ниже, чем для образцов *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* (Таблица 7).

Таблица 7. Описательная статистика генетической изменчивости неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus* spp.

Выборка	n	H	S	h	π	k	D
Локальные популяции							
Комиссаровка	27	23	56	$0,989 \pm 0,013$	$0,01525 \pm 0,00109$	9,467	0,002 - 0,032 (0,015)
Илистая	9	9	25	$1,000 \pm 0,052$	$0,01387 \pm 0,00134$	8,611	0,002 - 0,018 (0,014)
Павловка	10	10	27	$1,000 \pm 0,045$	$0,00988 \pm 0,00165$	6,133	0,005 - 0,016 (0,010)
Региональные популяции							
<i>N. schikhobalowi</i>	46	41	72	$0,994 \pm 0,006$	$0,01568 \pm 0,00080$	9,737	0,003 - 0,026 (0,016)
<i>N. salmincola</i>	91	76	75	$0,992 \pm 0,004$	$0,00814 \pm 0,00046$	5,057	0,002 - 0,014 (0,008)
<i>N. japonensis</i>	14	13	18	$0,989 \pm 0,031$	$0,01214 \pm 0,00081$	7,538	0,003 - 0,021 (0,012)

n – количество последовательностей; H – количество гаплотипов; S – количество полиморфных сайтов; h – гаплотипическое разнообразие (\pm S.D.); π – нуклеотидная изменчивость (\pm S.D.); k – среднее количество попарных отличий; D – диапазон p -дистанций, среднее значение указано в скобках.

При сравнении последовательностей *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, а также *N. japonensis* и *N. salmincola* было обнаружено 169 (из которых 135 являются парсимоний-информативными), 119 (из которых 91 является парсимоний-информативным) и 151 (120 являются парсимоний-информативными) переменных сайтов соответственно. Последовательности гена *nad1* в объединенной выборке (n=151) отличаются 190 нуклеотидами (155 информативны для парсимонии), которые приводят к 52 (из 207) аминокислотным заменам, из них фиксированные: 9 при сравнении *N. salmincola* и *N. schikhobalowi*, 13 при сравнении *N. salmincola* и *N. japonensis*, и 6 между *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* (Рисунок 33).

триплеты, используемые в гене, есть только у определенного вида. Так, триплеты AAC, CAG и CCA, кодирующие аспарагин, глутамин и пролин соответственно, используются только *N. japonensis*; триплеты CCG и CAU, кодирующие пролин и гистидин – *N. salmincola*, GAA и GCA, кодирующие глутаминовую кислоту и аланин встречаются как у *N. schikhobalowi*, так и *N. salmincola*, а AUC кодирует изолейцин только у *N. salmincola* и *N. japonensis*. Интересно, что *N. schikhobalowi* не имеет уникальных кодонов (т.е. используемых только этим видом нанофиетусов), только пара CGC и UCA кодонов, кодирующих аргинин и серин, характерна для этого вида и *N. japonensis*. В общей сложности, 6 кодонов (UCG (S), UAA (Y), CAC (H), AGC (S), CGG (R), GAC (D)) не используются ни одним из видов. Стоит сказать, что наиболее часто встречающиеся кодоны кодируют фенилаланин и лейцин. Идентифицированы уникальные по частоте встречаемости кодоны, для цистеина (UGU (C)) и тирозина (UAU (Y)) для *N. salmincola* и *N. japonensis* соответственно. Аминокислотный состав первой субъединицы NADH-дегидрогеназы у трех разных представителей *Nanophyetus* очень похож и включает около 1% отрицательно заряженных аминокислот, 16% ароматических, 20% полярных (гидрофильных незаряженных) и 60% неполярных (гидрофобных) аминокислот.

Дифференциация (d) между последовательностями *nad1* мтДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* составила 14,2 – 16,7% (в среднем 15,4%), *N. salmincola* и *N. japonensis* – несколько выше 15,2 – 17,7% (в среднем 16,2%), а для *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* – 9,2 – 11,2% (в среднем 10,3%).

В объединенной выборке идентифицировано 130 гаплотипов, распределение частот показано на Рисунке 34. Для *N. salmincola* идентифицировано 76 гаплотипов (H1 – H76), *N. schikhobalowi* – 41 (H77 – H117), а *N. japonensis* – 13 гаплотипов (H118 – H130), т.е. примерно пропорционально размеру видовой выборки. Общих для трех видов гаплотипов найдено не было. Мажорных гаплотипов ни для одной из популяций выявить не удалось. Для локальных выборок трематод из рек Комиссаровка, Илистая и Павловка выделено 22, 9 и 10 уникальных гаплотипов соответственно, с частотами от 4 до 10%

каждый. Стоит отметить, что почти все гаплотипы являются хозяиноспецифичными: Н78 – Н79, Н85 – Н101, Н104 – Н117 выделены из ленков, а Н77, Н80 – Н84, Н103 – из гольянов. Н102 – единственный общий гаплотип для локальных популяций *N. schikhobalowi* (Комиссаровка, Илистая, а также ленки, гольяны). Несмотря на то, что выборка нанофиетусов, извлеченных из карповых рыб меньше, их гаплотипическое разнообразие было выше (представлено 8 гаплотипов из 8 нуклеотидных последовательностей).

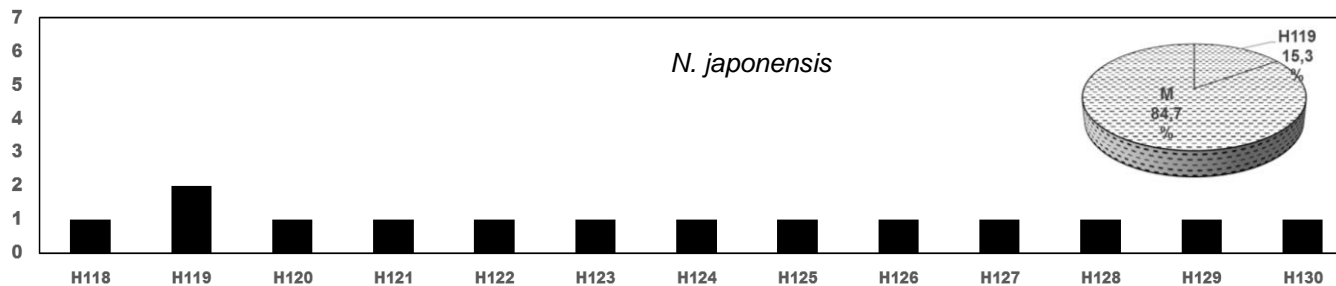
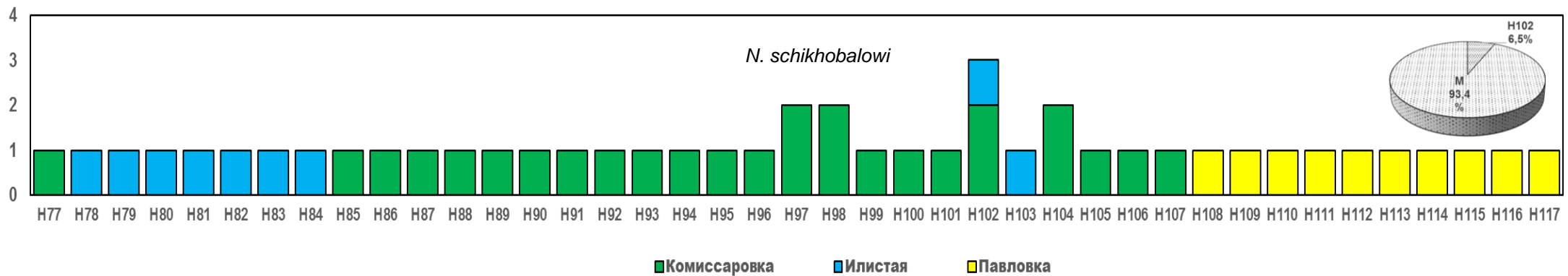
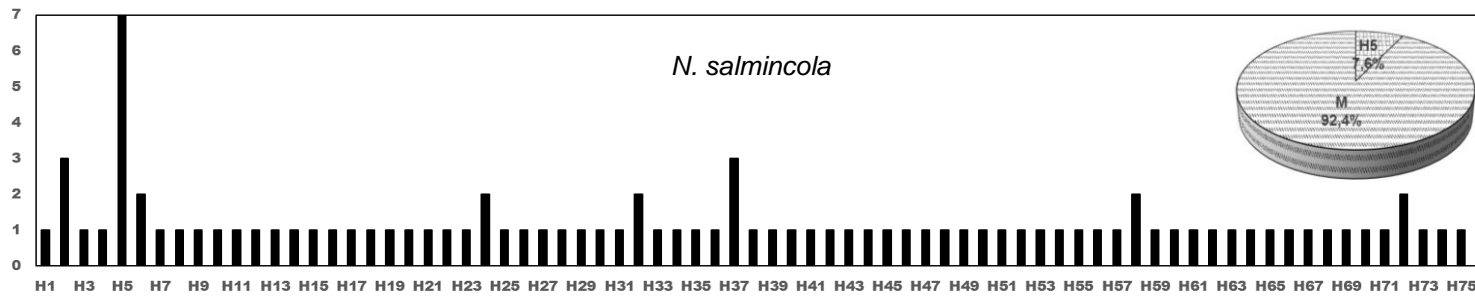
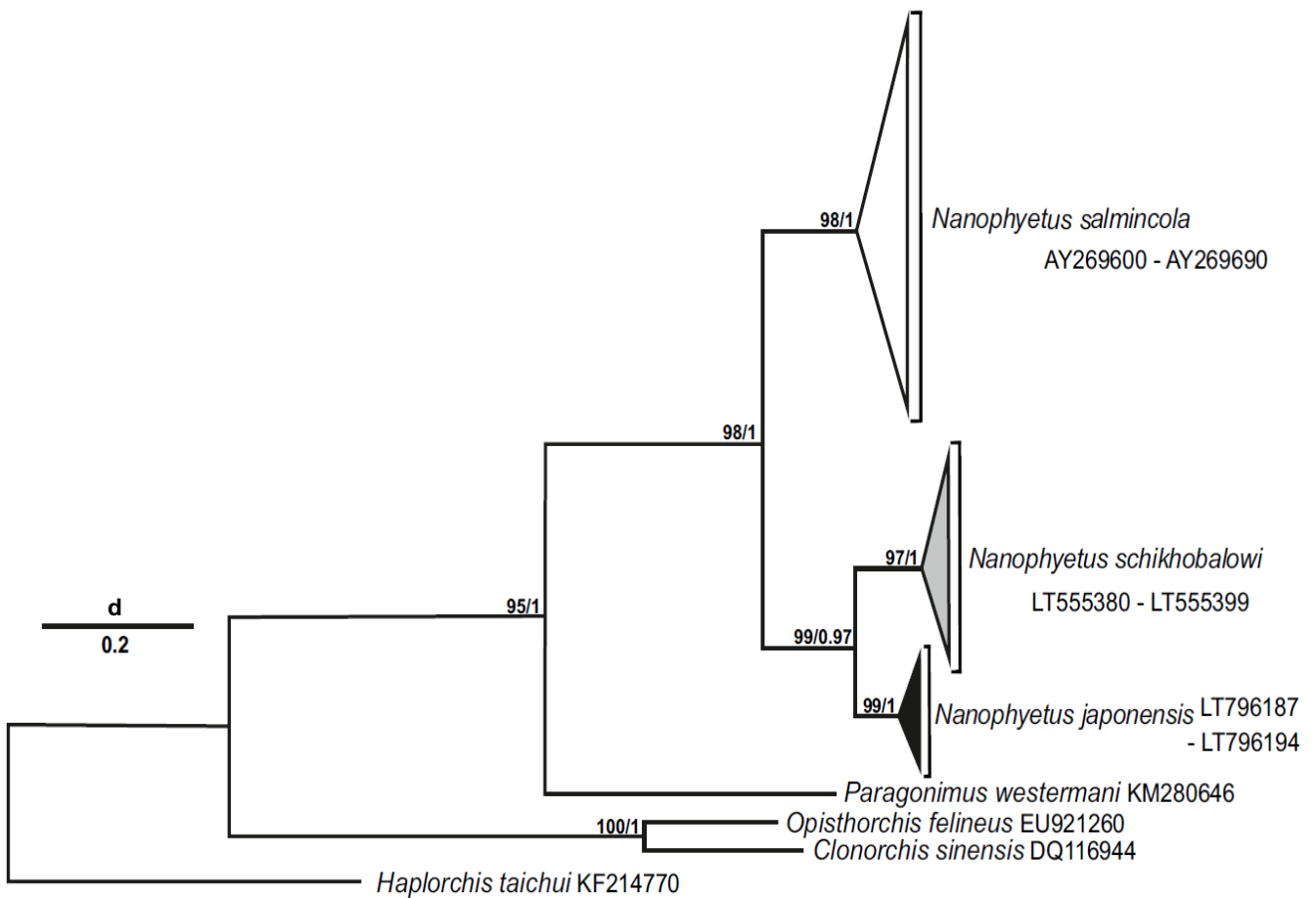


Рисунок 34. Частоты гаплотипов неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК для образцов *Nanophyetus* spp. из разных географических регионов, локальных популяций и рыб-хозяев. Процентное соотношение гаплотипов отображено на диаграммах. Н – гаплотип, М – минорные гаплотипы.

3.2.1.2. Внутривидовая филогения

Филогенетическое древо, построенное по данным маркера мтДНК *nad1*, является хорошо разрешенным, с высокими индексами бутстреп-поддержки для каждого представителя *Nanophyetus* (Рисунок 35А). Можно выделить две основные клады (индекс бутстреп-поддержки 98% и апостериорная вероятность 1,0 по Байесу). Первая объединяет последовательности *N. salmincola*, а вторая, разделяет *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* на две отдельные субклады (статистические поддержки 97%/1,0 и 99%/1,0 соответственно).

Филогенетическое древо, основанное на аминокислотных последовательностях, приведено на Рисунке 35Б. Ветви поддержаны достаточно хорошо и разделяют три вида нанофиетусов, благодаря большому числу информативных признаков.



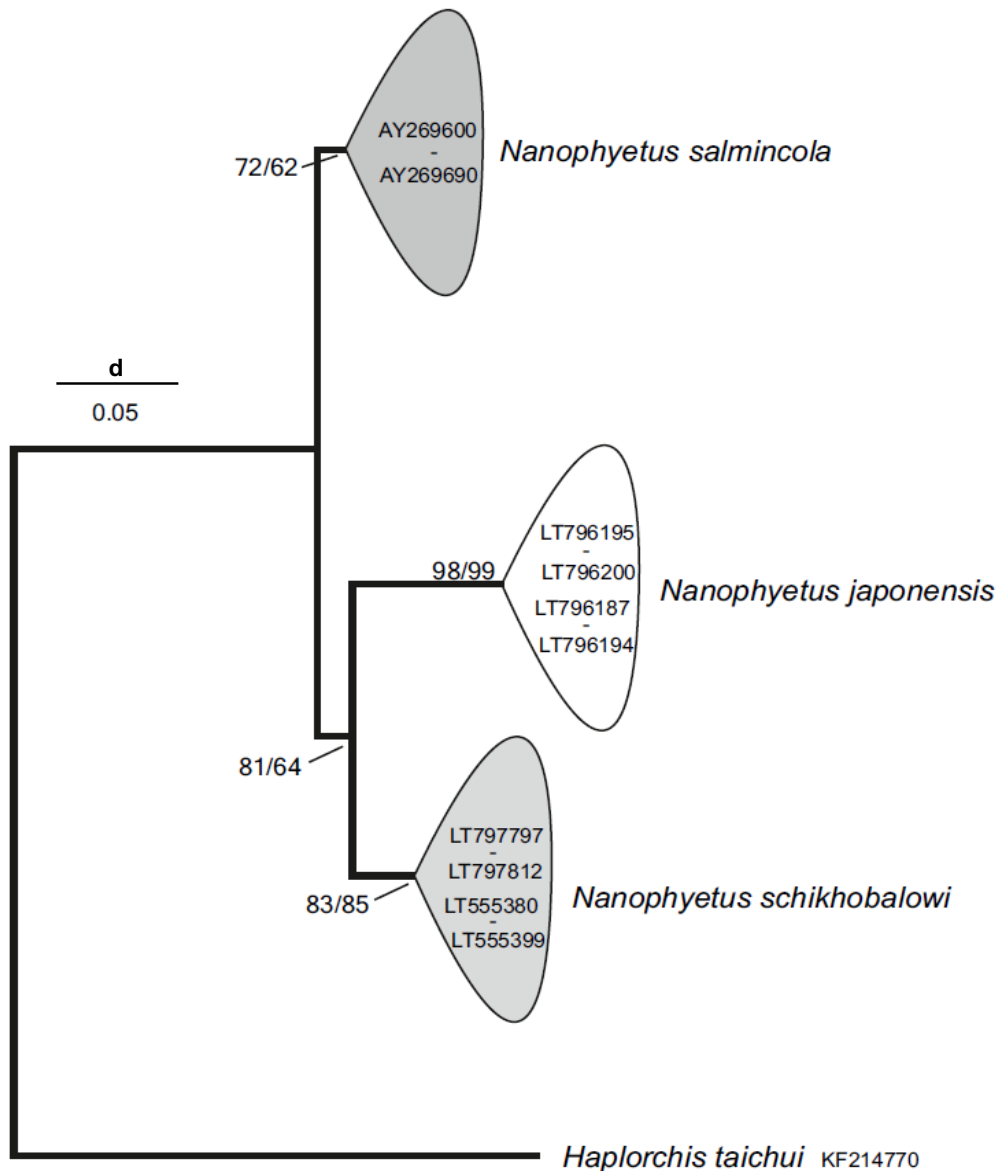


Рисунок 35. Филогенетические деревья, реконструированные на основе неполных последовательностей гена *nad1* (А), числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI); и прогнозированных аминокислотных последовательностей первой субъединицы NADH-дегидрогеназы (Б), значения бутстреп-поддержки показаны в узлах ветвления (NJ/ML).

3.2.1.3. Генетическая структура и популяционная история

Fst-статистика выявила существенно более низкую генетическую подразделенность между локальными выборками *N. schikhobalowi* ($Fst=0,0132 - 0,3288$, $P < 0,0001$) чем между географическими регионами ($Fst=0,8562 - 0,9462$, $P < 0,0001$), подтверждающую практически полное прекращение генных потоков

между видами (Таблицы 8, 9). Между популяциями нанофиетусов из ленков и гольянов и рек Комиссаровка и Илистая, впадающих в озеро Ханка, генные потоки сохраняются и поддерживаются на высоком уровне. Генные потоки между популяциями из этих рек и популяцией реки Павловка (приток Усури) значительно ограничены.

Таблица 8. Индексы генетической дифференциации *N. schikhobalowi* из локальных выборок рек и рыб-хозяев, вычисленные для неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК

Попарное сравнение выборок	<i>Fst</i> (P)	<i>Nm</i>	D (\pm S.D.)
Павловка/Комиссаровка	0,24900 (P = 0,0000)	1,32	0,017 (0,006)
Павловка/Илистая	0,32880 (P = 0,0000)	1,04	0,018 (0,005)
Комиссаровка/Илистая	0,03205 (P = 0,0000)	13,32	0,015 (0,004)
Ленки/Гольяны	0,01328 (P = 0,0000)	20,03	0,014 (0,004)

Fst-коэффициент генной фиксации (ARLEQUIN); P – уровень достоверности отличий (P \leq 0,05 считается существенным); D – *p*-дистанции (MEGA), в скобках указано значение стандартной ошибки, *Nm* – поток мигрантов.

Таблица 9. Индексы генетической дифференциации между образцами *Nanophyetus* spp. из различных регионов, вычисленные для неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК

Попарное сравнение	<i>Fst</i> (P)	<i>Nm</i>	D (\pm S.D.)
<i>N. schikhobalowi</i> / <i>N. salmincola</i>	0,93023 (P = 0,0000)	0,04	0,1542 (0,0146)
<i>N. schikhobalowi</i> / <i>N. japonensis</i>	0,85622 (P = 0,0000)	0,08	0,1016 (0,0117)
<i>N. japonensis</i> / <i>N. salmincola</i>	0,94624 (P = 0,0000)	0,03	0,1560 (0,0143)

См. примечание к таблице 8.

Для оценки филогенетических отношений между образцами и выявления преимущества между гаплотипами на основе неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК реконструировали древо минимальной протяженности (MST)

(Рисунок 36). На построенном MST древе хорошо видно, как гаплотипы группируются в соответствии с видовой принадлежностью, образуя протяженную гаплотипическую сеть.

Для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* расстояния между гаплотипами составляет от 1 до 9 мутационных шагов, для *N. salmincola* – 1 – 5 мутационных шагов, а между видами расстояния на порядок выше максимальных внутривидовых значений. Гаплотипы *N. salmincola* формируют компактную, но сложную конфигурацию с центральной (1-го порядка) звездчатой структурой и несколькими периферическими (2-го порядка) звездчатыми структурами, предположительно предковыми для которых является гаплотип H5 и гаплотипы H2, H56, H58, H30 соответственно. Примечательно, что в центре гаплотипической сети нанофиетусов находятся гаплотипы *N. schikhobalowi*, соединенные как с *N. salmincola* через гаплотип H81 (река Илистая – бассейн озера Ханка), так и с *N. japonensis* через гаплотип H113 (река Павловка – бассейн реки Уссури). В сети гаплотипов *N. schikhobalowi* можно выделить три основные филогруппы (*L1* – *L3*): *L1* – центральная звездчатая структура (предковый гаплотип H82, р. Илистая), *L2* – периферическая звездчатая структура, образованная только гаплотипами из Павловки (предковый гаплотип H113, р. Павловка), и *L3* – дивергировавшая от центральной структуры ветвь гаплотипов, включающая единственный общий для локальных популяций *N. schikhobalowi* гаплотип H102 (р. Илистая, р. Комиссаровка) (Рисунок 36). Связующие гаплотипы H81 и H82, принадлежат нанофиетусам, выделенным из карповых рыб, H113 – из лососевых, а H102 является единственным гаплотипом, общим для трематод из лососевых и карповых рыб-хозяев.

MJ-сеть для последовательностей гена *nad1* мтДНК в общем виде имеет сходство с MST. Сети демонстрируют слабо выраженную внутреннюю структурированность региональных популяций, где практически все группировки, так или иначе, оказываются связанными гипотетическими гаплотипами (Рисунок 37).

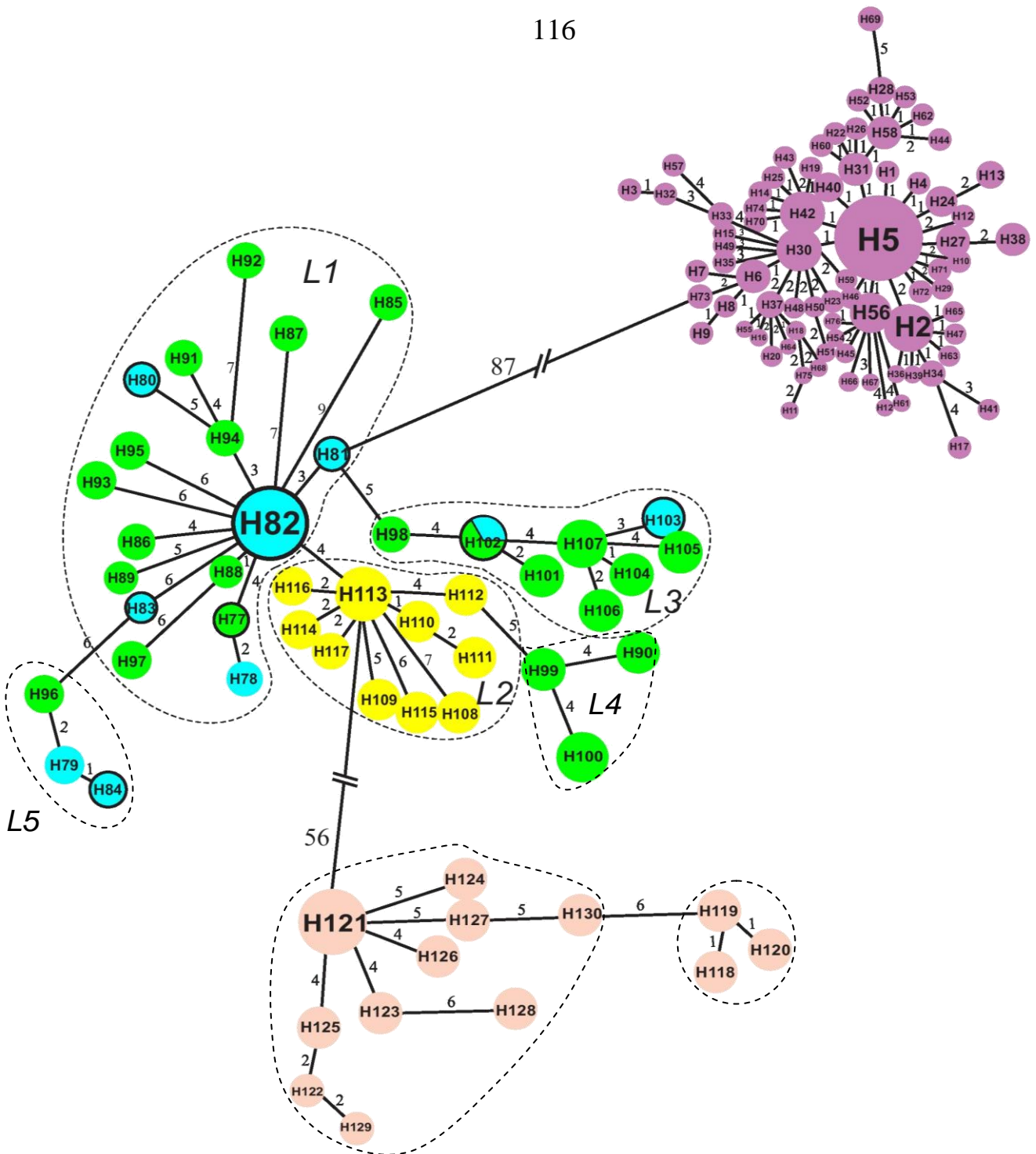


Рисунок 36. MST-дерево гаплотипов неполной последовательности гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus*. Длина ветвей пропорциональна количеству нуклеотидных замен. Гаплотипы, принадлежащие *N. salmincola* и *N. japonensis*, обозначены фиолетовым и розовым цветами соответственно. Гаплотипы *N. schikhobalowi* из Комиссаровки окрашены в зеленый цвет, Иистой – синий, Павловки – желтый. Гаплотипы образцов, выделенных из гольянов, обведены черными кругами, из ленков – без контура. Размер круга пропорционален числу отходящих от него связей.

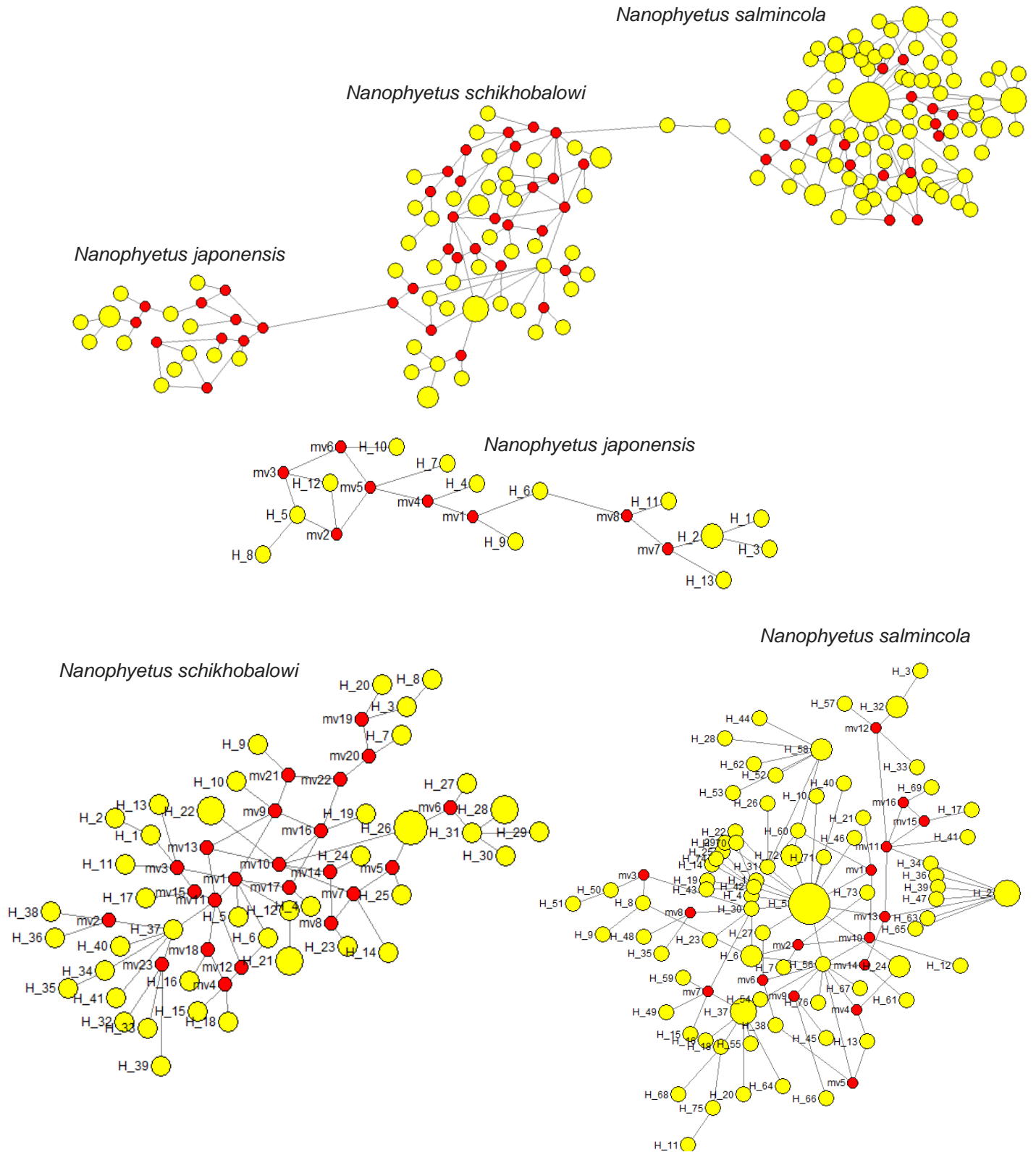
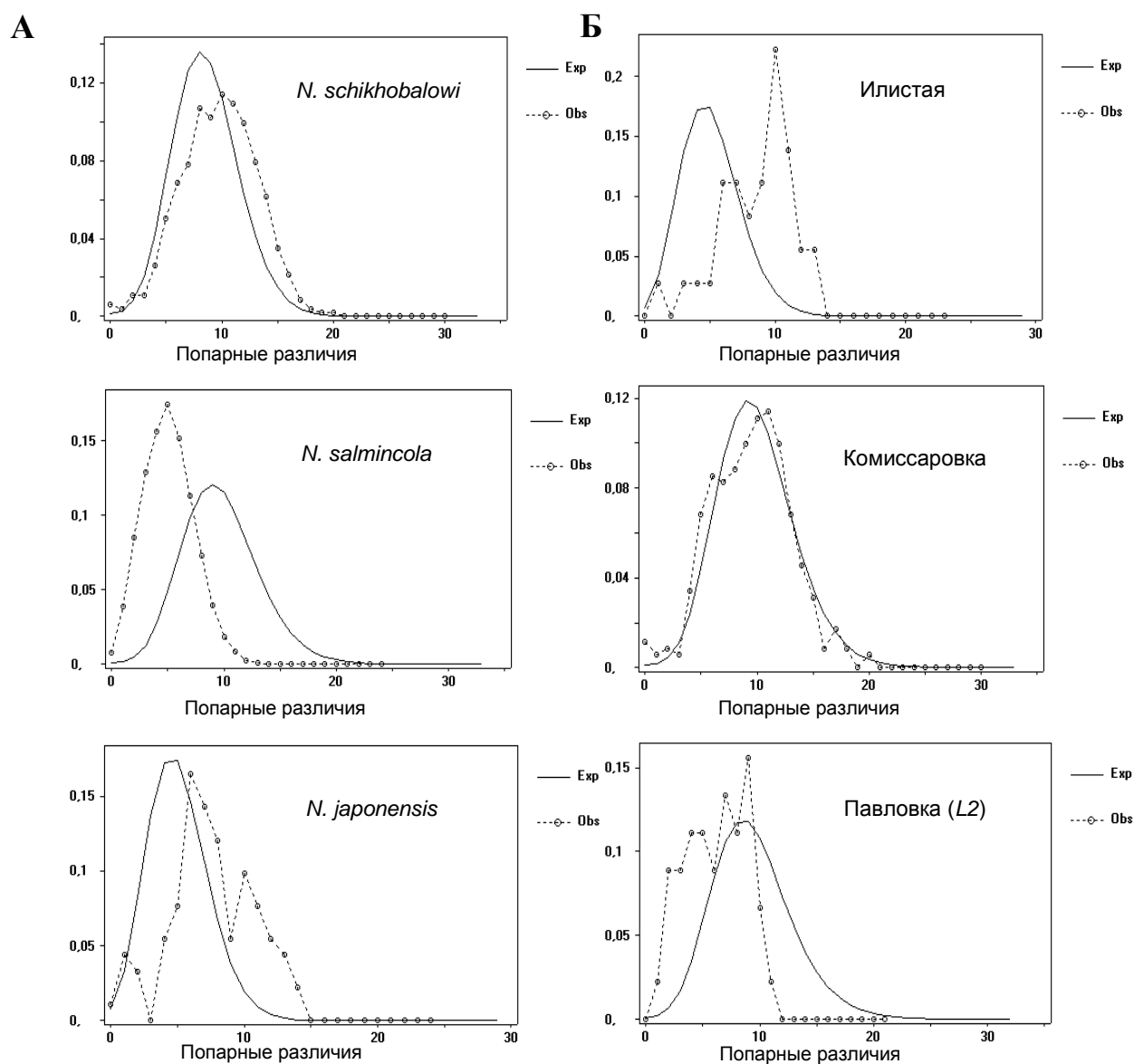


Рисунок 37. Медианная сеть гаплотипов гена *nad1* *Nanophyetus* spp. Желтые круги обозначают гаплотипы; размер круга пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. Красные круги (mv) – гипотетические гаплотипы, сгенерированные в программе Network ver. 5.0.0.3.

Анализ распределения попарных генетических отличий (mismatch distribution) показал унимодальное распределение (Рисунок 38) с высокой статистической поддержкой для *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*, и более низкой для *N. japonensis* (Таблицы 10, 11). Распределение попарных генетических отличий для локальных популяций и популяций *N. schikhobalowi* из разных видов рыб-хозяев также в целом соответствует унимодальному. Максимальные статистические отклонения (значения индексов шероховатости Харпендинга (HRI) и среднеквадратического отклонения (SSD)) обнаружены для выборки из Илистой и Павловки (Таблицы 10, 11). Интересно, что для выделенной нами филогенетической линии *L3*, в отличие от *L1* и *L2*, распределение попарных генетических дистанций имело выраженный мультимодальный характер.



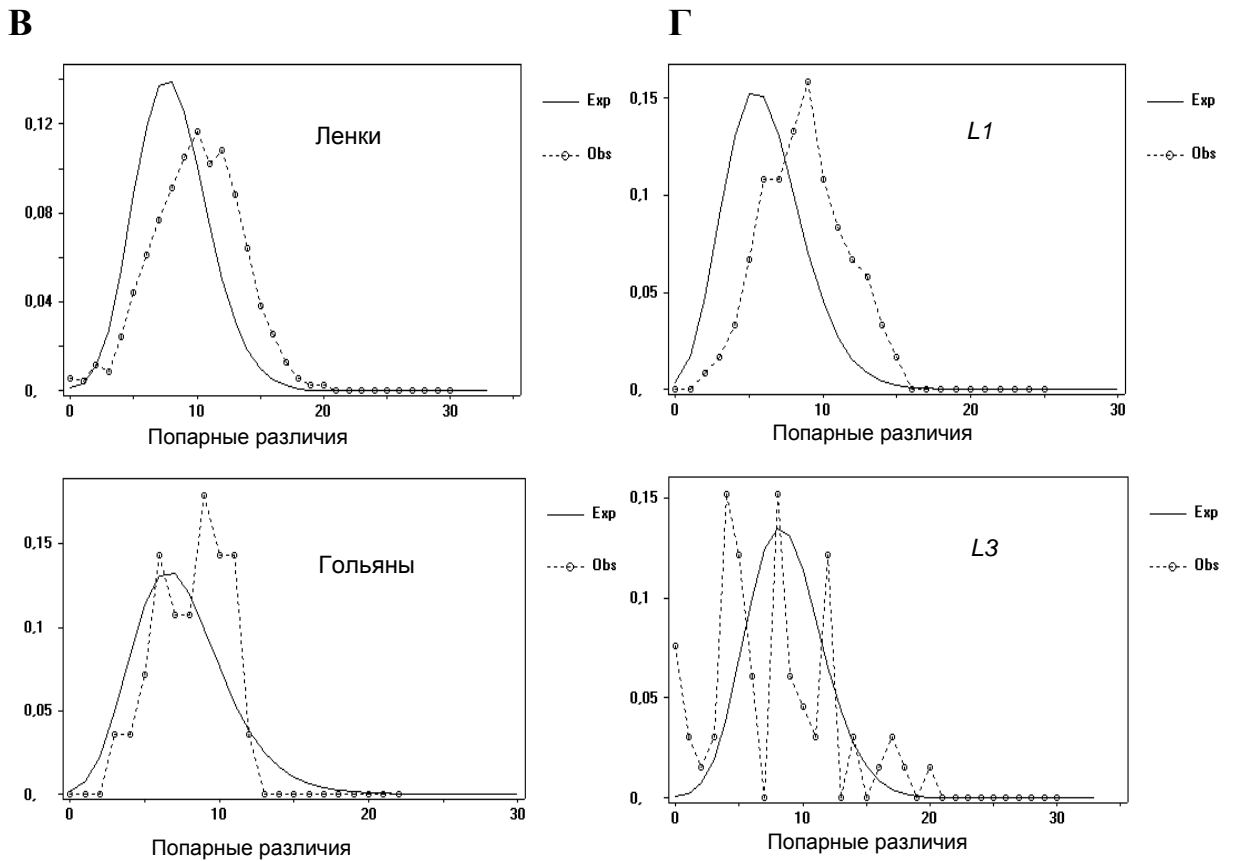


Рисунок 38. Графики распределения попарных генетических различий для гаплотипов неполной последовательности гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus* spp. из различных географических регионов (А); дальневосточных локалитетов (Б); видов рыб-хозяев (В) и филогенетических линий (Г). Сплошная линия – теоретически ожидаемая частота попарных различий для популяции с экспоненциальным ростом, пунктирная линия – реально наблюдаемая частота.

Значения статистики Таджимы D для *N. japonensis*, локальных популяций *N. schikhobalowi* рек Илистой и Комиссаровки, а также выборки *N. schikhobalowi* из гольянов не достигли уровня статистической значимости. Однако, результаты F_u 's F_s теста на селективную нейтральность показали высокие, достоверно отрицательные значения для нанофиетусов из всех географических регионов (т.е. видов) и локальных популяций, за исключением филогруппы *L3* и выборки из гольянов (Таблицы 10, 11).

Параметр τ , оценивающий время начала экспансии, для *N. schikhobalowi* составил 6,77539 (при 5% отклонении). Для установления времени популяционной экспансии использовали формулу $\tau=2ut$, где u – скорость мутации,

a t – время дивергенции в поколениях. Поскольку в настоящее время невозможно точно оценить ни скорость мутации мтДНК нанофиетусов, ни среднюю продолжительность их поколений, мы воспользовались данными Этвуда с соавторами (Attwood et al., 2008), согласно которым скорость нуклеотидных замен равна 2,5% на млн. лет для частичной последовательности гена *cox1* *Schistosoma mansoni*, а в перерасчете для гена *nad1* – 2,8% (т.е. $8,96 \cdot 10^{-6}$ замен/сайт/год) и время жизни поколения равное 1 году. В соответствии с перечисленными допущениями, демографическая экспансия нанофиетусов происходила 195 – 380 тыс. лет назад сразу после пространственной экспансии, имевшей место 280 – 500 тыс. лет назад, в одной и той же последовательности *N. schikhobalowi* → *N. japonensis* → *N. salmincola* (Таблицы 10, 11). Временные оценки демографического роста для локальных популяций и выборок *N. schikhobalowi* из различных видов рыб-хозяев отличались. Датировки событий популяционной экспансии, происходившей в локальных популяциях рек Комаровка и Илистая (бассейн оз. Ханка), намного превышали таковые для локальной популяции из р. Павловка (бассейн р. Уссури). Пространственная экспансия для выборки из разных видов рыб-хозяев датируется одним временем, однако демографическая экспансия выборки из ленков (лососевые) значительно опережала таковую для голянов (карповые) (Таблицы 10, 11). На построенных в BEAST древах, для одновременной оценки времени дивергенции рыб и трематод, показано, что виды *Nanophyetus* сформировались примерно – 2 – 5 млн. лет назад, почти одновременно со своими основными промежуточными хозяевами – лососевыми рыбами (в пределах 5 – 6 млн.л.н.) (Рисунок 39).

Таблица 10. Параметры демографической экспансии, вычисленные для неполной последовательности гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus* spp.

Выборка	Статистика <i>D</i> Таджимы		<i>F_s</i> -статистика (Fu's test)		Параметры демографической экспансии				Статистические критерии согласия			
	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>	τ	θ_0	θ_1	<i>t</i>	<i>SSD</i>	<i>P</i>	<i>HRI</i>	<i>P</i>
Комиссаровка	-1,329	0,079	-10,41	0,001	6,150	1,190	99,121	340000	0,0023	0,76	0,0053	0,94
Илистая	-0,317	0,387	-3,197	0,033	6,988	0,000	99999,0	389500	0,0162	0,51	0,0401	0,62
Павловка (L2)	-1,708	0,030	-5,105	0,006	2,257	0,000	124,53	125000	0,0343	0,24	0,02074	0,95
Ленки	-1,457	0,053	-22,67	0,000	7,451	0,404	119,17	415000	0,0007	0,96	0,0040	0,99
Гольяны	-0,653	0,298	-2,641	0,055	5,291	0,004	99999,0	295000	0,0099	0,90	0,0280	0,94
L1	-1,509	0,058	-9,239	0,002	8,789	0,000	99999,0	488000	0,0013	0,93	0,0091	0,91
L3	-0,990	0,159	-0,000	0,492	4,607	4,642	25,566	255000	0,0330	0,30	0,0833	0,19
<i>N. schikhobalowi</i>	-1,440	0,045	-24,66	0,000	6,775	0,000	491,88	380000	0,0073	0,08	0,0042	0,99
<i>N. japonensis</i>	-1,756	0,949	-5,505	0,010	4,046	1,345	88,438	225000	0,0089	0,51	0,0228	0,58
<i>N. salmincola</i>	-2,158	0,002	-25,48	0,000	5,068	0,145	130,78	195000	0,0003	0,85	0,0114	0,78

D и *F_s* – индексы нейтральности, *P* – уровни достоверности, τ – временной коэффициент, *t* – время экспансии, θ_0 и θ_1 – мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности популяции, *SSD* – среднеквадратичное отклонение, *HRI* – индекс шероховатости Харпендинга. Жирным шрифтом выделены статистически не подтвержденные значения.

Таблица 11. Параметры пространственной экспансии, вычисленные для неполной последовательности гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus* spp.

Выборка	Статистика <i>D</i> Таджики		<i>F_s</i> -статистика (Fu's test)		Параметры пространственной экспансии				Статистические критерии согласия			
	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>	τ	θ	<i>M</i>	<i>t</i>	<i>SSD</i>	<i>P</i>	<i>HRI</i>	<i>P</i>
Комиссаровка	-1,329	0,079	-10,41	0,001	8,879	1,838	83,4233	495000	0,0025	0,80	0,0053	0,98
Илистая	-0,317	0,387	-3,197	0,033	9,586	0,010	99999,0	535000	0,0162	0,56	0,0401	0,71
Павловка (L2)	-1,708	0,030	-5,105	0,006	4,984	2,539	99999,0	279000	0,0114	0,63	0,0207	0,93
Ленки	-1,457	0,053	-22,67	0,000	10,178	1,186	152,471	568000	0,0009	0,85	0,0040	0,99
Гольяны	-0,653	0,298	-2,641	0,055	8,787	0,010	99999,0	490000	0,0099	0,82	0,02806	0,90
L1	-1,509	0,058	-9,239	0,002	8,789	0,001	99999,0	489000	0,0013	0,98	0,0091	0,96
L3	-0,990	0,159	-0,000	0,492	4,607	4,612	10,549	270000	0,0308	0,46	0,0833	0,31
<i>N. schikhobalowi</i>	-1,440	0,045	-24,66	0,000	8,934	1,295	159,797	500000	0,0009	0,72	0,0042	0,94
<i>N. japonensis</i>	-1,756	0,949	-5,505	0,010	6,797	1,741	88,9937	380000	0,0092	0,54	0,0228	0,63
<i>N. salmincola</i>	-2,158	0,002	-25,48	0,000	5,068	0,478	610,578	283000	0,0003	0,77	0,0114	0,79

См. примечание к таблице 10.

M – число мигрантов.

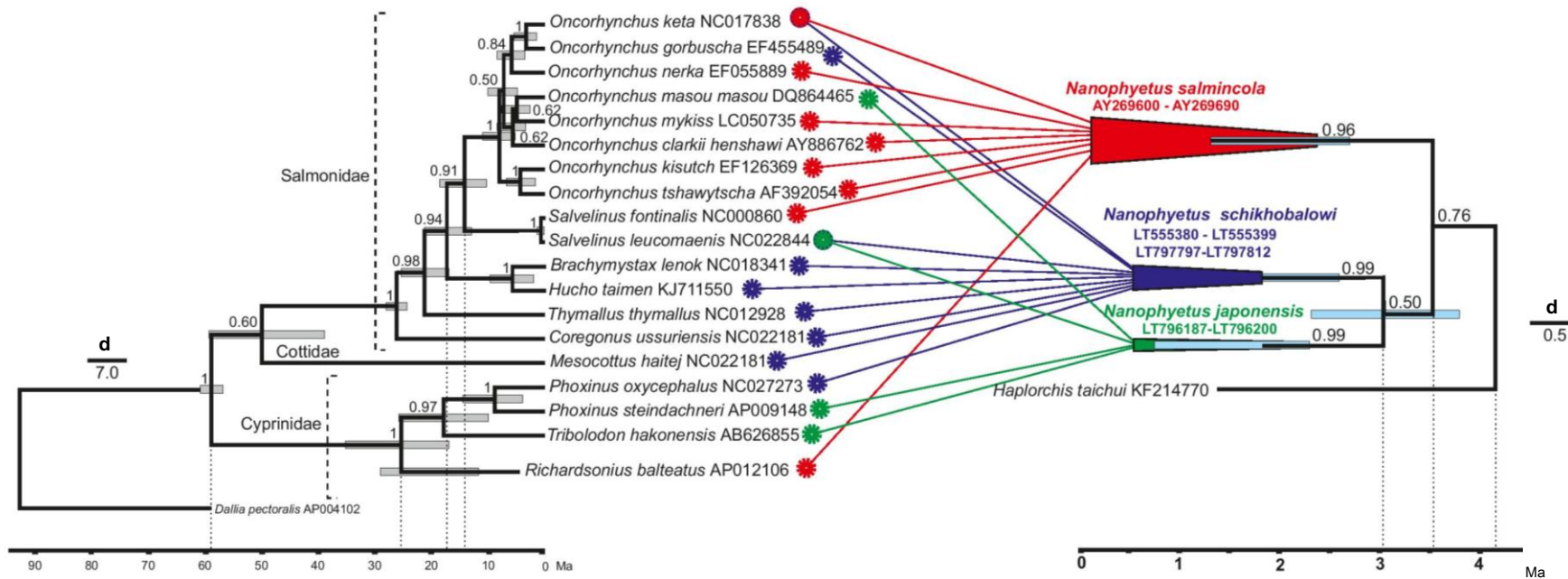


Рисунок 39. Филогенетические деревья с вычислением времени дивергенции *Nanophyetus* spp. и их промежуточных хозяев, основанные на сравнении неполных последовательностей гена *nad1*. Значения апостериорных вероятностей (BEAST) более 0,7 показаны в узлах ветвления, серые и синие прямоугольники – 95% интервалы наивысшей апостериорной плотности оценок времени существования клад. Длина нуклеотидных последовательностей – 972 п.н. для рыб; 600 п.н. – для *Nanophyetus* spp.

Анализ байесовских контурных диаграмм со средним и медианным значением N_eT демонстрирует наличие общего тренда развития популяций нанофиетусов (Рисунки 40, 41, 42). Наблюдается повышение эффективной численности, находящейся в отрицательном диапазоне. На графиках, построенных для *N. schikhobalowi*, показано, что 250 – 100 тыс. лет назад происходило плавное и устойчивое повышение численности трематод, но значение едва достигает положительного, а последние 100 тыс. лет, наоборот, отмечается стабильность популяции и замедление роста (Рисунок 40А, Б).

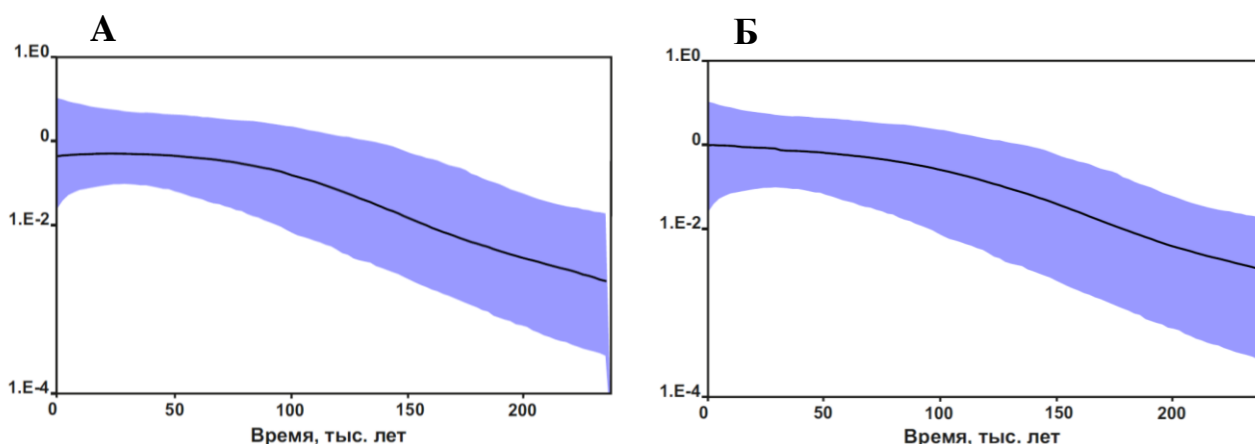


Рисунок 40. Байесовские контурные диаграммы, построенные для неполных последовательностей мтДНК *N. schikhobalowi*. График показывает изменение показателя N_eT (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее значение (Б) показателя N_eT , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

Байесовские контурные диаграммы для *N. salmincola* демонстрируют рост эффективной численности популяции нанофиетуса 120 – 40 тыс. лет назад, особенно в диапазоне 60 – 40 тыс. лет (Рисунок 41А, Б). График с использованием медианных значений характеризуется более резким скачком популяционного роста (Рисунок 41Б). Последние 40 тыс. лет идет стабилизация численности популяции. В отличие от *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* N_eT *N. salmincola* имеет положительные значения.

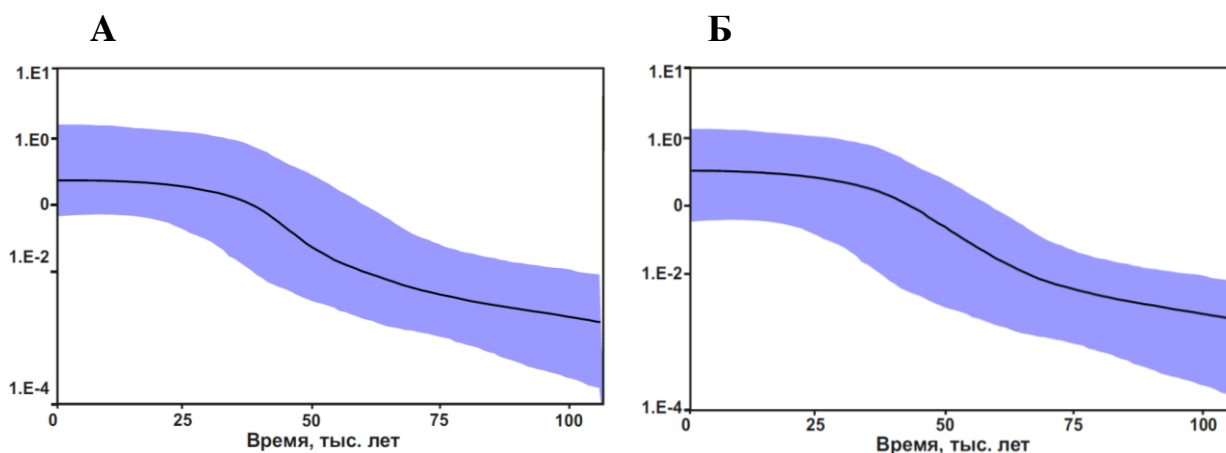


Рисунок 41. Байесовские контурные диаграммы, построенные для неполных последовательностей мтДНК *N. salmincola*. График показывает изменение показателя N_eT (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее значение (Б) показателя N_eT , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

Байесовские контурные диаграммы А и Б на Рисунке 42 демонстрируют постепенное увеличение численности *N. japonensis*, начавшееся около 175 тыс. лет назад и продолжающееся до настоящего времени, однако значения N_eT пока не превышают нулевых показателей.

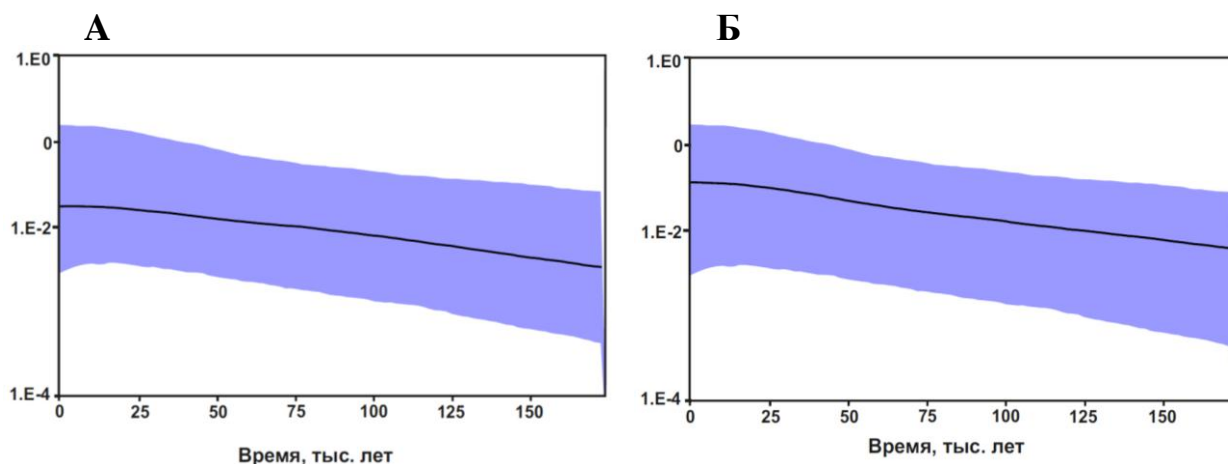


Рисунок 42. Байесовские контурные диаграммы, построенные для неполных последовательностей мтДНК *N. japonensis*. График показывает изменение показателя N_eT (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее значение (Б) показателя N_eT , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

3.2.2. Характеристика полноразмерного гена *nad1* *N. schikhobalowi*

В настоящей работе была определена полноразмерная последовательность гена *nad1*, кодирующего первую субъединицу NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi* длиной 897 п.н. Сравнительная характеристика полноразмерных последовательностей гена *nad1* *N. schikhobalowi* и других видов плоских червей, доступных в GenBank, приведена в Таблице 12.

Таблица 12. Сравнительная характеристика полноразмерных последовательностей гена *nad1* и кодируемого им белка

Вид	Размер нукл-ых послед-стей гена п.н.	АТ/GC	Размер амин-ых послед-стей белка	Часто используемые кодоны	RSCU
<i>Nanophyetus schikhobalowi</i>	897	1,50	299	UUU(F) - 22	1,83
				UUA(L) - 15	2,05
<i>Paragonimus westermani</i>	888	1,02	296	UUG(L) - 18	2,3
				UUU(F) - 17	1,06
<i>Echinostoma hortense</i>		1,81	300	UUU(F) - 33	1,89
				UUG(L) - 23	3,29
				UGU(C) - 16	1,88
<i>Fasciola hepatica</i>	900	1,86	300	UUU(F) - 38	1,95
				UUG(L) - 29	3,95
				GUU(V) - 29	2,83
<i>Fasciola gigantica</i>	900	1,72	300	UUU(F) - 38	2
				UUG(L) - 33	4,3
				GUU(V) - 32	3,05
<i>Fascioloides magna</i>	900	1,59	300	UUG(L) - 34	1,94
				UUU(F) - 31	4,34
				GUU(V) - 24	2,34
<i>Haplorchis taichui</i>	903	1,51	301	UUU(F) - 30	1,94
				UUG(L) - 21	2,63
				GUG(V) - 18	1,89
<i>Metorchis orientalis</i>	900	1,52	300	UUU(F) - 32	1,94
				GUU(V) - 17	1,79
<i>Metagonimus yokogawai</i>	906	1,29	302	UUU(F) - 24	1,5
				UUG(L) - 17	2,22
				GUG(V) - 18	1,89
<i>Clonorchis sinensis</i>	900	1,65	300	UUU(F) - 33	1,78
				UUG(L) - 17	2,17
				AUU(I) - 16	2,18
				GUU(V) - 15	2,07
<i>Opisthorchis viverrini</i>	900	1,59	300	UUU(F) - 31	1,88
				GUG(V) - 18	1,8
				GUU(V) - 16	1,6

RSCU (англ. Relative synonymous codon usage) – показатель предпочтительности в использовании синонимичных кодонов

Размер нуклеотидных последовательностей гена *nad1* варьирует от минимального 888 п.н. (*P. westermani*) до максимального 906 п.н. (*M. yokogawai*). Интересно, что у представителей надсемейства Gorgoderoidea (*N. schikhobalowi*, *P. westermani*) последовательности *nad1* самые короткие в данной выборке. Ген АТ-богатый, отношение АТ/ГС в среднем 1,55, с минимальными значениями 1,02 и 1,29 у *P. westermani* и *M. yokogawai* соответственно и максимальным – 1,86 у *F. hepatica*. По частоте использования кодонов трематоды имеют определенные различия. Бесспорно доминирующим является кодон UUU(F). В отличие от других видов у *N. schikhobalowi* с высокой частотой используется UUA(L).

Древо, основанное на сравнении полноразмерных аминокислотных последовательностей с высокими уровнями статистической поддержки (индексы бутстреп-поддержки были от 70 до 100%) в узлах ветвления, определило положение *N. schikhobalowi*, как наиболее близкородственного семейству Paragonimidae. Причем семейства Troglotrematidae и Paragonimidae образуют общую кладу с семействами Opisthorchiidae и Heterophyidae, а семейства Echinostomatidae и Fasciolidae – статистически поддержанную сестринскую кладу (Рисунок 43).

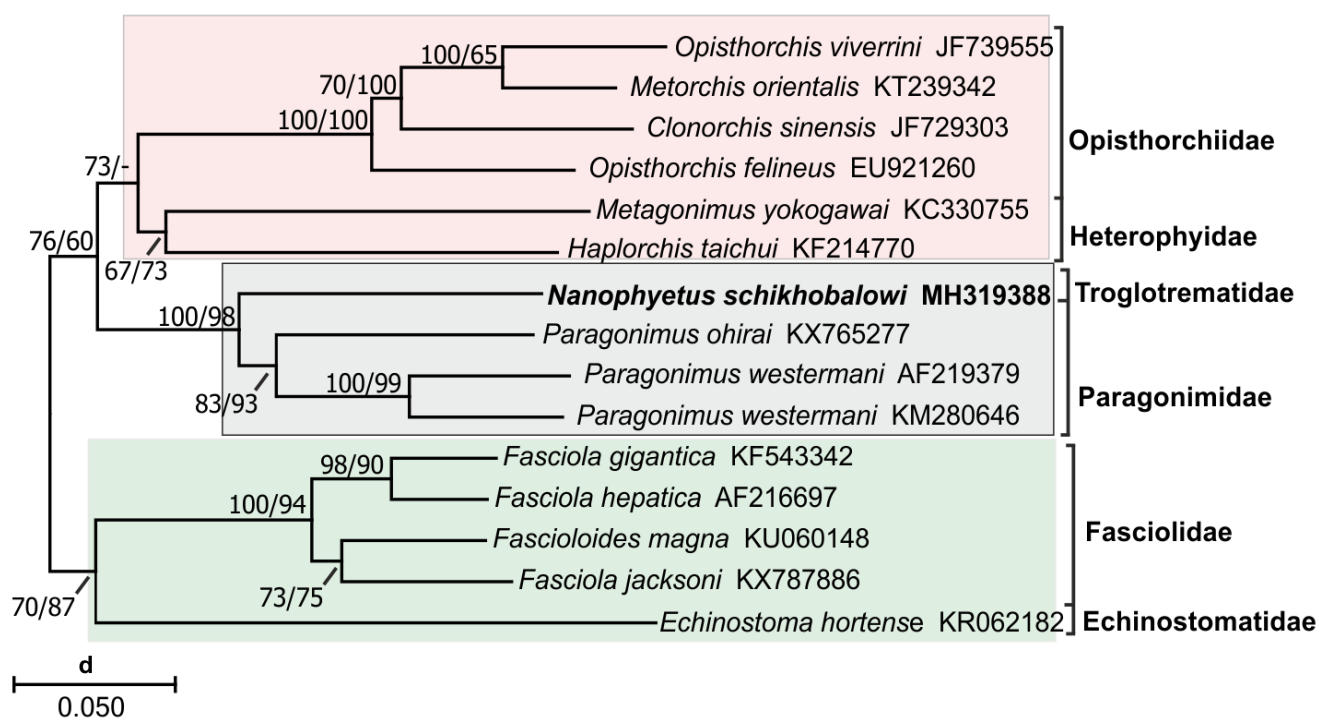


Рисунок 43. Филогенетическое древо, реконструированное на основе аминокислотных последовательностей первой субъединицы NADH-дегидрогеназы методом максимального правдоподобия и методом объединения соседей. Значения бутстреп-поддержки больше 50 показаны в узлах ветвления (NJ/ML). Цветом выделены отдельные клады, соответствующие подотрядам, серый – Xiphidiata, розовый – Opisthorchiata, зеленый – Echinostomata.

3.2.2.1. Модель белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*

Впервые для трематод были получены трехмерные и двухмерная модели первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi* (Рисунки 44, 45, 46).

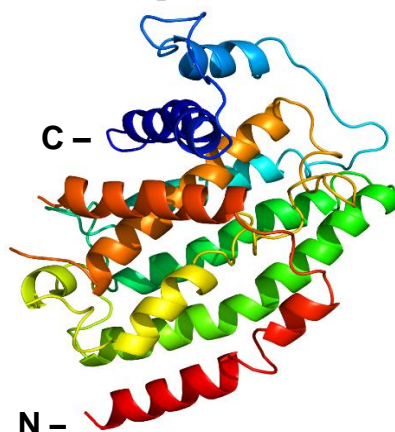


Рисунок 44. Трехмерная модель первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*. Радужная окраска изображения N → C terminus (The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis).

Прогнозируемый сайт связывания молекулы первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi* образован семью аминокислотными остатками (LEU – 189, CYS – 190, GLU – 191, CYS – 192, ASN – 193, ASP – 198, 199 – TYR) (Рисунок 45).

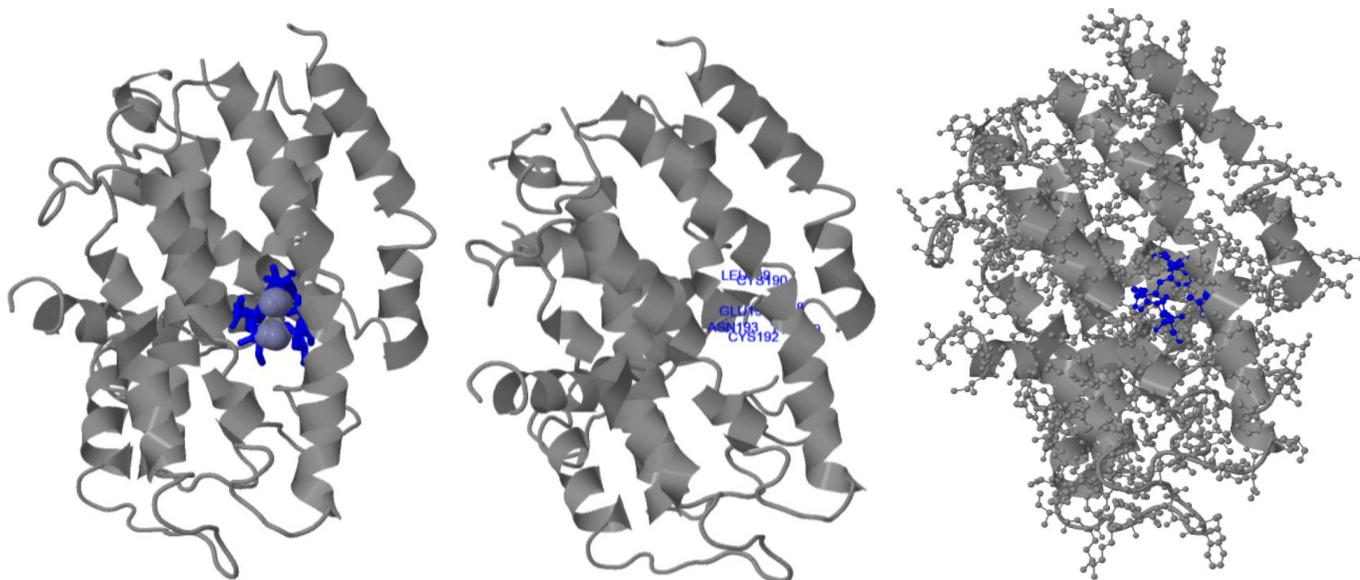
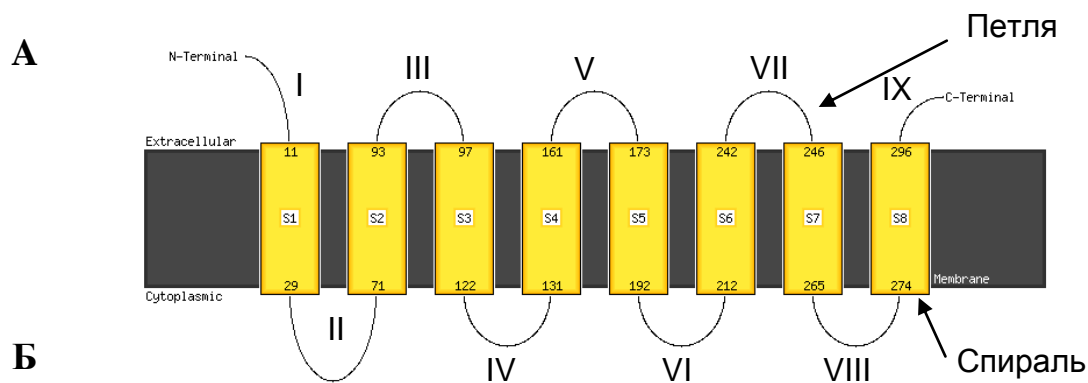


Рисунок 45. Сайт связывания с гетерогенным лигандом (окрашен синим), отображенный на трехмерной модели первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*. Представлено несколько вариантов визуализации.

288 аминокислотных остатков (96% последовательности) были смоделированы с достоверностью 100% и с 30%-сходством с молекулой NADH млекопитающих. 82% белка составляют альфа спирали, 65% – трансмембранные спирали, бетта-складчатого слоя не обнаружено (Рисунок 46).



S1 – 15, 27;

S2 – 73, 84, 89, 92;

S3 – 102, 107, 109, 112, 117;

S4 – 136, 137, 140, 141, 144, 149,

153, 158;

S5 – 185.

I – 4, 5;

II – 35, 36, 45, 51, 53, 56, 58, 60, 64, 66-68,70;

III – 95;

IV – 124, 125, 127;

V – 163, 168, 170, 171;

VI – 194, 197, 204, 206, 207.

Рисунок 46. Схематичное изображение (2D) трансмембранного расположения первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi* (The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis) (A), с обозначением локализации аминокислотных замен в каждой спирали (Б). S1 – S8 – трансмембранные спирали; I – IX – петли. Сайты с аминокислотными заменами указаны в соответствии с Рисунком 33.

Большинство аминокислотных замен при сравнении неполных последовательностей *N. schikhobalowi* с *N. salmincola* и *N. japonensis* располагаются неравномерно. Самой вариабельной петлей оказалась петля II. Трансмембранные спирали в целом содержат меньше аминокислотных замен (Рисунок 46).

Для анализа структурных и функциональных сайтов было использовано несколько подходов. Часть атомов в аминокислотных остатках могут находиться слишком близко друг к другу. На представленной модели (Рисунок 47А) остатки окрашены (от синего к красному) в зависимости от количества возможных столкновений друг с другом (англ. clash analysis). Большое количество столкновений может означать «плохое» размещение боковых цепей или неправильный фолдинг в данном участке. Критерии столкновения особенно строги. Аминокислотные остатки на модели лежат в благоприятных (синих), разрешенных (зеленых) или запрещенных (красных) областях по карте

Рамачандрана (англ. Ramachandran analysis). Красный цвет указывает на аминокислотные остатки, возможно, «имеющие проблемы» с вращением торсионных углов Φ/Ψ (Рисунок 47Б). Угол Φ – угол вращения вокруг связи N-C α ; угол Ψ – угол вращения вокруг связи C α -C(O). Аминокислотные остатки в белке не одинаково важны. Некоторые из них необходимы для поддержания правильной структуры и функции, тогда как другие, могут быть легко заменены. Программа Phyre2 анализирует консервативность последовательности (англ. conservation analysis) с использованием теоретико-информационного подхода, основанного на расхождении Дженсена-Шэннона (Capra, Singh, 2007). Участки, окрашенные синим цветом, характеризуются низкой степенью консервативности, красным – высокой (Рисунок 47В). Вариабельные области важны для функционирования многих белков, поскольку они являются динамически гибкими (Рисунок 47Г). Прогнозирование вариабельности (англ. disorder prediction) может стать ценным инструментом для определения нестабильных участков, препятствующих успешной кристаллизации белка. На модели отображена градация цвета от синего (консервативность) к красному (вариабельность). Структура белка *N. schikhobalowi* характеризуется средней степенью вариабельности/консервативности, примерно 50/50%. Инструмент SuSPect был использован для предсказания того, могут ли миссенс-мутации в исследуемом белке иметь функциональный/фенотипический эффект с точностью более 80% (mutational sensitivity). Позиции окрашены в соответствии со средним эффектом 20 возможных мутаций в данном положении, от фиолетового и синего цвета – слабый эффект, к красному – сильный (Рисунок 47Д). Белок слабо подвержен мутационным изменениям.

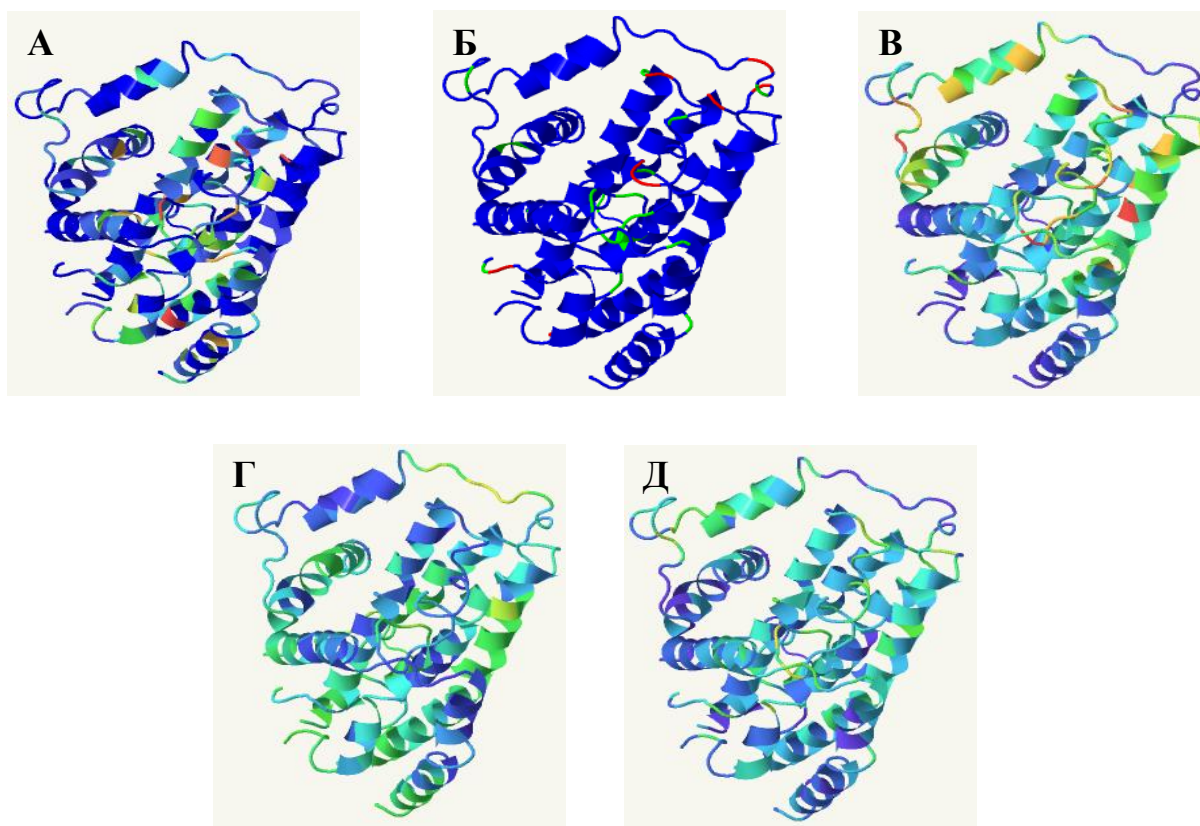


Рисунок 47. Результаты анализа структурных и функциональных сайтов, отображенные на трехмерных моделях первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*: анализ столкновений (clash analysis) (А); анализ Рамачандрана (Ramachandran analysis) (Б); анализ консерватизма (conservation analysis) (В); прогнозирование нарушений (disorder prediction) (Г); чувствительность к мутациям (mutational sensitivity) (Д).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Особенности распределения генетического разнообразия внутри и между видами рода *Nanophyetus*

В настоящей работе мы сравнивали *Nanophyetus* spp. из Российского Дальнего Востока, Японских островов и Северной Америки с помощью мультилокусных молекулярных данных. Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) рДНК наиболее часто используют как маркеры для дискриминации видов трематод, либо как критерий внутривидовой генетической изменчивости (Bazsalovicsova et al., 2010; Razo-Mendivil et al., 2010; Sanabria et al., 2011; Thaenkham et al., 2012), поэтому мы опирались, прежде всего, на данные по этому участку. Уровни нуклеотидных отличий ITS1-5,8S-ITS2 последовательностей между региональными популяциями соответствовал уровням межвидовой дивергенции, наблюдаемой в различных таксонах трематод (Morgan, Blair, 1995; Tkach, Snyder, 2007, 2008; Brant, Loker, 2009; Snyder, Tkach, 2011; Curran et al., 2013; Kasl et al., 2014). Как правило, внутривидовая дифференциация для ITS1-5,8S-ITS2 рДНК плоских червей не превышает 1%, хотя известны и более высокие ее уровни (Nolan, Cribb, 2005; Chen et al., 2007a; Kasl et al., 2014; Atopkin et al., 2015). Дивергенция между *N. salmincola* и *N. schikhobalowi* с *N. japonensis* намного больше, чем их внутривидовая дифференциация, и достигает почти 14% в ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, указывая, что они действительно принадлежат разным видам. Дивергенция между *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* значительно ниже, но тоже соответствует межвидовому уровню. Например, согласно опубликованным данным, межвидовая дивергенция в ITS1-5,8S-ITS2 рДНК варьирует в диапазоне 0,5 - 7,8% у конгенеричных видов, принадлежащим различным семействам трематод: *Trichobilharzia*, *Schistosoma* (Schistosomatidae) *Diplostomum* (Diplostomatidae), *Haematoloechus* (Haematoloechidae), *Homalometron* (Apocreadiidae), *Echinostoma* (Echinostomatidae), *Macroderoides* (Macroderoididae), *Aporchis* (Plagiorchiidae) и *Alloglossidium* (Alloglossidiidae) (Morgan, Blair, 1995; Tkach, Snyder, 2007, 2008; Brant, Loker, 2009; Curran et al., 2013; Kasl et al., 2014; Blasco-Costa et al., 2016).

Максимальные уровни межвидовой дивергенции отмечены для *Plagiorchis* spp. (Zikmundova et al., 2014). Высокие уровни межвидовой дивергенции получены также для ITS1 региона *Paragonimus*, филогенетически близкого роду *Nanophyetus* (Van Herwerden, 1999).

Результаты по двум другим рибосомным маркерам подтверждают выводы, сделанные для ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, и соответствуют межвидовой дивергенции в других таксономических группах трематод (Lapierre, 2011; Chen et al., 2007b). Обычно внутривидовые генетические расстояния представителей одного семейства по 18S рДНК меньше 1% (Munoz et al., 2013). При сравнении неполных последовательностей гена 28S рРНК дивергенция между видами нанофьетусов составила 0,1 – 0,6%. Эти значения вполне соответствуют нижним пределам межвидовых отличий трематод внутри одного рода (Miller, Cribb, 2007; Zikmundova et al., 2014; Atopkin, Shedko, 2014).

В качестве инструмента для установления филогенетических связей видов, а также географического распределения внутривидовой генетической изменчивости успешно практикуется анализ дивергенции линий митохондриальной ДНК (мтДНК) (Blouin et al., 1998; Vilas et al., 2005; Semyenova et al., 2006; Tantrawatpan et al., 2013). Высокие показатели межвидовых генетических расстояний для *Nanophyetus* spp. ($d=10,3 - 16,2\%$) хорошо согласуются с данными для других конгенеричных видов плоских червей (Bazsalovicsova et al., 2015). Уровень дивергенции митохондриального гена *nad1* между видами в родах *Echinostoma*, *Fasciola*, *Schistosoma* и *Drepanocephalus* варьирует от 10,3 до 35,4% (Vilas et al., 2005; Pinto et al., 2016). С другой стороны, внутривидовая изменчивость трематод часто обусловлена одиночными нуклеотидными заменами в генах мтДНК и обычно не превышает 2 – 4% (Vilas et al., 2005; Semyenova et al., 2006; Liu et al., 2012). Из этих наблюдений совершенно ясно, что даже наиболее низкие генетические расстояния между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* соответствуют межвидовому уровню дивергенции.

Кроме того, сравнительный анализ данных по рДНК и мтДНК маркерам показал отсутствие общих рибо- и гаплотипов для нанофьетусов из разных

регионов, свидетельствующее о глубокой дифференциации сравниваемых популяций с полным завершением сортировки митохондриальных линий, а также высокие значения генных фиксации (отражающие практически полное прекращение генных потоков). Филогенетические реконструкции, основанные на данных обоих маркеров, с высокой статистической поддержкой группируют в отдельные монофилетические клады представителей *N. salmincola*, *N. japonensis* и *N. schikhobalowi*. Поэтому, основываясь на совокупности полученных молекулярных данных и ранее опубликованных морфологических различий, мы восстанавливаем валидность *N. schikhobalowi* как самостоятельного вида и подтверждаем видовой статус *N. japonensis* и *N. salmincola*.

Характер генетического разнообразия и популяционная структурированность паразитов, особенно со сложным жизненным циклом как у трематод, зависит от взаимодействия множества факторов. В отличие от свободноживущих организмов, паразиты ассоциированы как с окружающей средой, так и внутренней средой хозяина, которые оказывают значительное влияние на паразита (Harvell et al., 2002; Ponton et al., 2006).

Представление о популяции паразитов как генетически однородных сообществ, основанное на том, что самооплодотворение и бесполое размножение, вовлеченные в их жизненные циклы, ведут к уменьшению генетической изменчивости, в последнее время изменилось. Использование молекулярных маркеров выявило высокую гетерогенность церкарий из одной и той же спороцисты, а также между дочерними спороцистами у многих видов трематод (Vilas et al., 2005; Корсуненко, 2010; Лопаткин и др., 2010; Хрисанфова и др., 2011). Таким образом, при определенном соотношении смешанного клонального и полового размножения уровень гетерозиготности у популяции неотличим от наблюдаемого при строгом половом размножении (Balloux et al., 2003). Козволюция паразита и хозяина приводит, в частности, к локальным адаптациям паразита к локальному генотипу хозяина и таким образом к большей дифференциации между последующими поколениями (Lively, Dybdahl, 2000). Тем не менее, внутри хозяина генетическое разнообразие на личиночной стадии у

моллюсков значительно ниже, чем у взрослых трематод, а отдельный дефинитивный хозяин может иметь примерно половину генетического разнообразия от всей популяции паразита (Sorensen, Minchella, 2001; Herrmann et al., 2014). Действительно, значения генетической изменчивости, полученные для видовых популяций нанофиетусов, в целом оказались вполне сопоставимы как с данными для других видов трематод (Tatonova et al., 2012; Chelomina et al., 2014), так и для их потенциальных дефинитивных хозяев (например, Sakka et al., 2010).

Анализ внутривидового генетического разнообразия *N. schikhobalowi* выявил два типа изменчивости: географическую и хозяиноспецифическую. Генетическая подразделенность паразитических популяций между видами (или расами) их хозяев известна, хотя различия часто ассоциировались с разным географическим положением или особенностями мест обитания (Harvell et al., 2002; Johnson et al., 2002; Wang et al., 2006; Sun et al., 2013). Основываясь на данных, полученных ранее и собственных результатах, Челомина с соавторами (Chelomina et al., 2014) полагают, что не существует видоспецифических филетических линий для дефинитивных хозяев *C. sinensis*, по-видимому, из-за непродолжительности времени эволюционного взаимодействия, по сравнению с тем, что было для первого и второго промежуточных хозяев. Именно поэтому низкая генетическая дифференциация обнаружена в выборках *C. sinensis* из рыб, кошек и собак (Sun et al., 2013). Между тем, были выявлены специфичные гаплотипы, которые принадлежали только *C. sinensis*, выделенным из кошки, хотя неясно, связано это с внутренними взаимодействиями паразита и хозяина, или все же с другими факторами, например, с географическими параметрами (Sun et al., 2013). К сожалению, подобных работ известно немного. Поэтому в настоящем исследовании мы сравнивали не только отдельные географические выборки и выборки из разных видов хозяев между собой, но и выборки из разных хозяев в разных локалитетах (речных системах). Мы допускаем, что расширение выборок может повлиять на результаты, однако принципиальные изменения в выводах маловероятны в силу явных межпопуляционных различий.

Географическое происхождение часто связано с генетической дифференциацией популяций, когда наблюдается снижение генетической дифференциации у пространственно близких популяций и ее увеличение при больших географических дистанциях. Это самая простая модель генетической изоляции популяций (*Isolation by distance*, изоляция дистанциями) (Bohonak, 2002). Выраженный географический вектор с севера на юг в распределении генетического разнообразия был продемонстрирован для китайской печеночной двуустки (Tatonova et al., 2012; Solodovnik et al., 2018). Однако в настоящем исследовании эта модель поддержки не получила; нашим данным больше соответствует модель с изолированными группами. Так, реки Комиссаровка и Илистая входят в состав бассейна оз. Ханка, поэтому их системы не являются абсолютно изолированными. Аналогично, популяционные выборки нанофиетусов из этих рек генетически гораздо менее дифференцированы между собой (с существенными генными потоками), чем каждая из них с выборкой из р. Павловка (бассейн р. Уссури) или Комаровка (бассейн р. Раздольная).

Интересно, что наиболее полиморфной оказалась популяция из р. Илистой, что может быть связано как с историей расселения вида, так и с общей эпидемиологической обстановкой. Из доклада об экологической ситуации в Приморском крае за 2015 год стало известно о том, что в реке Илистая дважды наблюдалось высокое загрязнение соединениями алюминия. Токсичность алюминия связана с многообразием химических форм и его миграционной способностью в водных средах (Владимиров и др., 2000). Свободные ионы алюминия в токсических концентрациях наносят большой вред живым клеткам, вызывают хромосомные абберации, а механизмы ингибирующего действия этого металла на цитогенетическом уровне еще не до конца изучены (Буланова и др., 2002).

В целом, каждая локальная популяция характеризовалась наличием уникальных рибо- и гаплотипов, указывающих на отсутствие полной панмиксии. Популяция нанофиетусов из реки Павловки, не имеет общих рибо-/гаплотипов ни с одной из других локальных популяций, но именно посредством гаплотипа из

Павловки-Уссури образуется связь с популяцией *N. japonensis*. Эта информация имеет важное значение для выяснения исторических связей между популяциями нанофиетусов, прогнозирования эпидемиологической ситуации в данном регионе, и выявления очагов нанофиедоза.

В настоящем исследовании мы показали также, что в одинаковых условиях внешней среды формируется выраженная хозяиноспецифичность нанофиетусов. Были обнаружены хозяиноспецифичные рибо- и гаплотипы, особенности в распределении нуклеотидного разнообразия в последовательностях яДНК и мтДНК, низкая, но статистически значимая фиксации межпопуляционных потоков генов и разные демографические истории популяций из ленков и гольянов. Эти данные можно объяснить проявлением микроэволюционных механизмов адаптации паразита к смене промежуточного хозяина. Важность влияния хозяев на создание генетически отличных линий паразита признается в течение длительного времени. Спектр хозяев может существенно влиять на внутривидовую генетическую структуру и создавать барьеры, препятствующие потоку генов (Nadler et al., 2000; McCoy et al., 2001; Johnson et al., 2002, McCoy et al, 2005).

4.2. Пространственные структуры биомолекул

Очень часто вес филогенетического сигнала отдельных нуклеотидных замен оценить не представляется возможным, т.к. далеко не обязательно те или иные мутации гена влекут за собой изменение вторичной структуры транскрибируемой РНК, что в свою очередь, является критическим фактором ее функциональности. Анализ вторичных структур способен прояснить спорную ситуацию. Отмечено, что чем меньше функциональная важность отдельных участков генов, тем больше их тенденции к эволюционной изменчивости (Kimura, 1980). Все три вида нанофиетуса имеют свой уникальный набор вставок и делеций в ITS1, что приводит к изменению конформации вторичных структур спейсеров (Рисунки 15 – 17), важных для выполнения необходимых биологических задач. Показано, например, что у дрожжей правильная конформация вторичных структур ITS

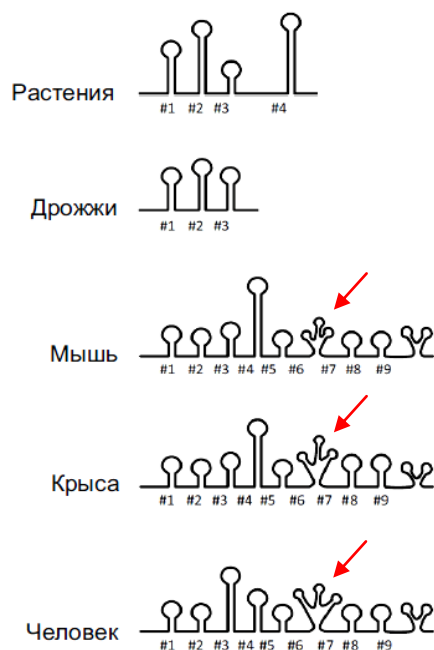
участков принципиально важна для корректного протекания процессинга первичных транскриптов рРНК (Capriotti, Marti-Renom, 2008; Lotfy et al., 2010).

ITS1 и ITS2 находятся под давлением отбора на вторичные структуры, поэтому они значительно отличаются по средним значениям свободной энергии, числу спиралей и количеству вариантов фолдинга. Причем различия между уровнями низких значений свободной энергии и числом вторичных структур статистически значимы (Giudicelli et al., 2017).

У большинства эукариот, не являющихся позвоночными, общая вторичная структура ITS1 представляет собой три спирали: №1, №2 и №3 (иногда меньше, иногда больше), за которыми следует СА-богатый участок, не имеющий спаривания, и короткая четвертая спираль №4. Как показано для дрожжей (Рисунок 48), четвертая спираль часто отсутствует. Протяженные последовательности ITS1 позвоночных не имеют узнаваемого сходства с ITS1, найденным у растений, грибов, и у других беспозвоночных и протистов. У млекопитающих ITS1 имеет девять спиралей, несколько разветвленных и неспаренных областей, богатых СА. Отличительной особенностью ITS1, которую разделяют только птицы и млекопитающие, является почти идентичная (только с отличием в один нуклеотид) последовательность 15 п.н на 3'-конце короткой спирали №5 (Coleman, 2015).

На рисунке 48 видно, что структуры ITS1 *N. schikhobalowi* имеют большую сложность по сравнению со структурами растений, дрожжей и млекопитающих. На 3'-конце локализуется элемент со сложной структурой (напоминающий трезубец) аналогичный таковому у млекопитающих – их потенциальных дефинитивных хозяев.

А



Б

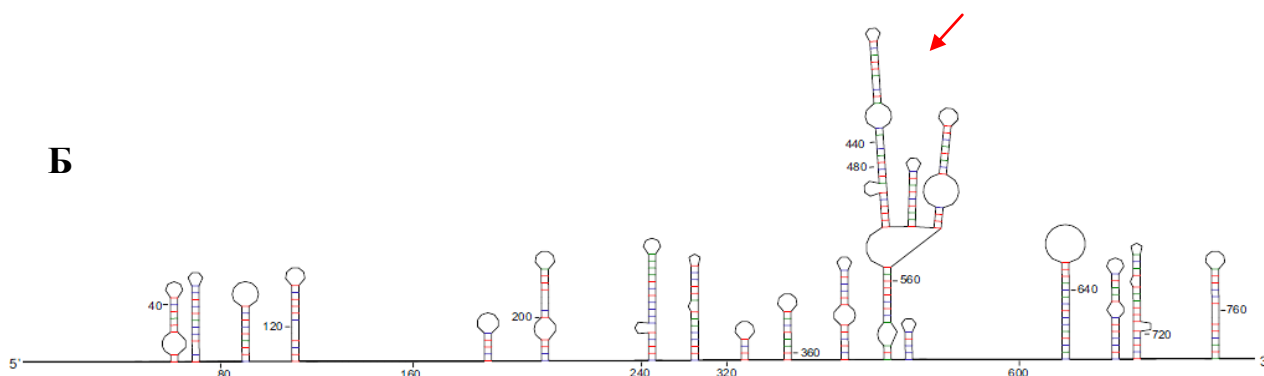


Рисунок 48. Схематичное изображение вторичной структуры ITS1 дрожжей, растений и млекопитающих (А) (Coleman, 2015) и *N. schikhobalowi* (Б) (Mfold). Стрелками обозначены самые сложные элементы структуры ITS1, с высоким сходством у разных видов млекопитающих и трематод.

У видов *Nanorhynchus* большинство локализованных нуклеотидных замен оказались компенсаторными, около 70%, обеспечивающих формирование канонических связей между нуклеотидами в спиральях (Рисунок 15). Наличие компенсаторных мутаций подтверждает видовую самостоятельность таксонов (Coleman, 2003). Существование термодинамически устойчивой в молекулах РНК неканонической пары (G-U) дает возможность происходить односторонним заменам, сохраняющим спаренность нуклеотидов в двухцепочечной спирали. Такие мутации названы полукompенсаторными заменами оснований. Сайты, в

которых возникают как компенсаторные, так и полукомпенсаторные замены, важны для поддержания каркаса вторичной структуры. Низкое содержание G-U пар указывает на высокую стабильность спиралей. Вид может существовать в ожидании компенсаторных мутаций, накапливающихся до определенного предела жизнеспособности, при превышении которого начинает действовать естественный отбор (Dover 1986; Hancock et al., 1988).

Выявленные особенности конформации ITS1 *N. japonensis*, *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* при сохранении общей формы укладки, могут быть объяснены реализацией дифференциальных механизмов эволюционного отбора после отделения видов от общего предка. Можно предположить, что у *N. salmincola* смещение локализации двух шпилек во вторую ветвь способствует небольшому повышению уровня свободной энергии и, возможно, как следствие – изменению вирулентного потенциала трематоды. В ходе моделирования вторичных структур ITS1 *C. sinensis* Татоновой Ю.В. с соавторами было показано, что дополнительный повтор (5`-GCCTG-3`) стабилизирует вторичную структуру китайского сосальщика и уменьшает энергию фолдинга. По мнению авторов, риботипы «с повтором» могли быть более успешными для эволюционной адаптации трематод в печени млекопитающих, а тяжесть протекания клонорхоза связана с наличием в спейсерной области этой пентануклеотидной вставки (Tatonova et al., 2012). Доказательства того, что в ITS1 содержится информация о вирулентности вида, были получены для паразитических протистов рода *Leishmania* (Schönian et al., 2001). Вариации в последовательностях ITS1 акантамеб коррелируют с типами последовательностей 18S рДНК (Köhler et al., 2006). Случаев заражения людей *N. salmincola* в естественных условиях описано мало. Примечательно, что *N. salmincola* содержит в целом меньшее число теломерных и регуляторных мотивов, как в ITS1, так и в ITS2, а спейсеры *N. schikhobalowi* более насыщены fox мотивами. Количество свободной энергии для фолдинга вторичных структур, как ITS1, так и ITS2 *N. japonensis* меньше, чем требуется на реконструирование вторичных структур этих спейсеров *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* (Voronova et al., 2017). Может ли заражаться человек *N. japonensis* на данный момент также

остаётся не известным. В любом случае структуры ITS1 транскриптов *Nanophyetus* являются одними из самых сложно организованных среди исследованных видов трематод (Michot et al., 1993; Hofacker et al., 1994; Capriotti, Marti-Renom, 2008; Lotfy et al., 2010; Ghatani et al., 2012; Tatonova et al., 2012).

Более низкий уровень изменчивости и меньший размер ITS2 позволяет выявлять общие паттерны укладки моделей вторичных структур данного региона для широкого спектра дигеней (Michot et al., 1993; Morgan, Blair, 1995; Tatonova et al., 2012). Сходство на уровне первичных последовательностей ITS2 видов *Nanophyetus* отразилось на их вторичных структурах (Рисунок 17). В то время, как конформация доменов А и В была неизменной, самый длинный (в виде шпильки) домен С и домен D несли несколько замен. Для моногеней и трематод в целом характерно то, что домен С всегда больше, чем домен D, и, хотя оба домена высоковариабельны, у большинства семейств трематод они сворачиваются как неветвящиеся стебли (Morgan, Blair, 1995). Неразветвленность домена С, как например у Fasciolidae, предположительно есть его предковое, энергетически более выгодное состояние (Morgan, Blair, 1995). Стебель домена С у *N. japonensis* прямой и, в отличие от *N. salmincola* и *N. schikhobalowi*, содержит меньше внутренних петель, что, по-видимому, тоже является энергетически выгодным.

Идентификация консервативных мотивов указывает на сохранение функциональности ITS регионов. Найденные нами у нанофиетусов мотивы 5`-UGGU-3` характерны для эукариот (Schultz et al., 2005; Ghtani et al., 2012; Coleman et al., 2015). Как у всех трематод (Morgan, Blair, 1998б), в ITS2 нанофиетусов мы обнаружили консервативный участок 5`-GAGUCGUGGCUCA-3` в домене С, в то время как консервативный участок 5`-GGGUGCCAGAUC-3` имел только гомологичные последовательности.

Растущие клетки за один клеточный цикл должны синтезировать примерно 10 млн. рибосом. Рибосомные гены могут транскрибироваться с очень высокой интенсивностью, чему способствует наличие микросателлитных повторов (мотивов) – энхансерных последовательностей (короткие, до 6 п.н.) при каждом гене (Ленинджер, 1985; Noller, 2005). Энхансеры или цис-элементы – регуляторные

последовательности, расположенные на той же двухцепочечной молекуле, что и регулируемый ген. Цис-элементы обычно находятся вблизи сайта инициации транскрипции в направлении 5'-конца, но могут располагаться и на значительном отдалении, как от 5'-, так и от 3'-концов. Инсерция энхансерных последовательностей в межгенные спейсеры рДНК усиливает транскрипцию рРНК предшественников (Noller, 2005). Внутри ITS1-5,8S-ITS2 региона *Nanophyetus* spp. были идентифицированы мотивы регуляторных и теломерных последовательностей. При этом у *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* больше общего в их распределении, по сравнению с *N. salmincola*. Интересно, что мотивы располагаются как в спиральных, так и в петлях, но предпочтительнее все-таки первый вариант локализации. Столь широкое распространение регуляторных и теломерных мотивов в ITS паразитических плоских червей может указывать на их функциональную роль в регуляции тканеспецифической или стадий-специфической транскрипции рибосомных генов (Noller, 2005).

ТАТА-боксы или боксы Хогнеса (англ. TATAAT box) – консервативный мотив ДНК эукариот, имеющий последовательность 5'-ТАТААТ-3'. Располагается в промоторной области белок-кодирующих генов на расстоянии примерно 30 нуклеотидов до сайта начала транскрипции и соответственно контролирует ее инициацию (Doelling, Pikaard, 1996). Как ТАТААТ, так и обратная ему последовательность ТААТАТ могут выступать в качестве регуляторов, расположенных вне зоны промоторного участка (Doelling, Pikaard, 1996). 5'-ССААТ-3' box расположен выше ТАТААТ и у большинства эукариот активирует транскрипцию промоторов, содержащих ТАТА-боксы (Latchman, 1995; Li, 1997). Было описано несколько белков, которые связываются с ССААТ, что указывает на важность этого мотива не только в активации, но и в регуляции экспрессии генов (Latchman, 1995). У всех видов нанофийетусов мотив ССААТ (pro2) встречается с одинаковой частотой.

GC-боксы (англ. GC box) обычно являются частью GC-богатого региона, содержащего последовательности 5'-GGGCGG-3' или обратные им 5'-CCCGCC-3'. Эти последовательности могут активировать транскрипцию генов, кодирующих

белок, в присутствии транскрипционных факторов Sp1 (Rhodes, Klug, 1993; Latchman, 1995). К GC-боксам также относят 5`-GGCGG-3`, 5`-CCCGCC-3`, и 5`-CCGCC-3` мотивы. Кроме нанофиетусов аналогичные мотивы были ранее обнаружены в ITS1 регионе китайского печеночного сосальщика и у других видов трематод (Tatonova et al., 2012; Van Herwerden et al., 2003).

В хромосомах многих видов Metazoa помимо мотивов теломерных повторов на концах хромосом были также обнаружены интерстициальные теломерные последовательности (Meune et al., 1990; Lin, Yan, 2008). Они представляют собой либо остатки теломерных участков, появляющихся в результате хромосомных перестроек, или же являются следствием участия теломеразы в репарации ДНК. У позвоночных обнаружен мотив теломерного повтора 5`-TTAGGG-3` (Kilburn et al., 2001; Traut et al., 2007). Для нематод типичным мотивом является 5`-TTAGGC-3` (Ahn, Winter, 2006), для коловраток это 5`-TGTGGG-3` (Gladyshev, Arkhipova, 2007), а для членистоногих – 5`-TTAGG-3` (Vitkova et al., 2005). Для разных таксонов показана разная организация мотивов теломерных повторов. Некоторые виды Onychophora, Urochordata, Cephalochordata, Echinodermata, Platyhelminthes, большинство Annelida и Mollusca имеют «позвоночный» теломерный мотив (Traut et al., 2007). Мотивы теломерных повторов TTAGGG в геномах плоских червей были обнаружены только для нескольких видов: *Dendrocoelum lacteum* и *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Platyhelminthes) (Joffe et al., 1998), *Schistosoma mansoni* (Trematoda, Platyhelminthes) (Hirai, LoVerde, 1996; Bombarova et al, 2009). В культивируемых клетках хромосомные области, содержащие (TTAGGG)_n последовательности, как известно, являются «горячими точками» хромосомных перестроек, как индуцированных облучением, так и спонтанных (Alvarez et al., 1993; Bertoni et al., 1996; Slijepcevic et al., 1996; Day et al., 1998). Известно также, что внедрение мотивов TTAGGG в гены млекопитающих ведет к частым хромосомным перестройкам (Kilburn et al., 2001). Причины повышенной нестабильности в последовательностях, содержащих TTAGGG-мотив неясны, но китайский хомячок и некоторые другие модельные виды содержат интерстициальные теломерные последовательности в своих хромосомах на

протяжении миллионов лет, что свидетельствует о наличии защиты этих блоков от хромосомных перестроек в норме. Механизм такой защиты должен быть, по всей видимости, отличен от механизма образования Т-петли в теломерах, но он может включать сайт-специфическое распознавание TTAGGG белковыми транскрипционными факторами – TRF1 и TRF2 (Bailey, Murnane, 2006).

Эта работа является первой, посвященной моделированию переменных доменов вторичных структур 18S рРНК трематод. Общий вид предполагаемой вторичной структуры 18S рРНК *Nanophyetus* spp., для которой в качестве реперной была использована модель 18S рРНК *Triticum aestivum*, разработанная Армаче с соавторами, соотносится с другими эукариотическими моделями (Armache et al., 2010; Yu et al., 2013; Petrov et al., 2014; Chelomina et al., 2016), но имеет ряд отличительных особенностей.

Изменения в организации вторичных структур 18S рРНК иерархичны. Первый уровень изменчивости различает представителей разных царств (De Rijk et al., 1992). Вторым уровнем характерен для типов и классов отдельных организмов (дрожжи, насекомые, черви, млекопитающие), с сохранением общего принципа укладки большинства спиралей: ES3^S, h16, h17, h24, h26, h39, h44-ES12^S (Woese et al., 1980; Gutell et al., 1985; Cannone et al., 2002; Gillespie et al., 2006; Zhao et al., 2013). К третьему типу относятся ES со специфической структурной изменчивостью, присущей уже конкретным отрядам и семействам организмов, например, однодольным, жесткокрылым и акариформным клещам (Matejusova, Cunningham, 2004; Gillespie et al., 2006; Zhao et al., 2013). По нашим данным, у трематод к таким участкам относятся ES6^S и ES9^S с самыми высокими значениями мутационной изменчивости (по Nv:Nt) для ES6^S и (по Nv:Nc) для h39-ES9^S. Вероятно, возникновение изменчивости по такому типу было необходимым условием эволюции, поскольку структурированные петли являются достаточно распространенным структурно-функциональным мотивом природных РНК и часто выполняют основную роль в обеспечении специфичности РНК-РНК-взаимодействий (Сериков и др., 2006).

Большинство моделей для ES6^S (бактерий, грибов, насекомых, червей, млекопитающих) 18S рРНК изображаются в виде больших, неупорядоченных областей, где последовательности, расположенные к 3'-концу более консервативны (Cannone et al., 2002). Структуры ES6^S всегда уникальны, сильно варьируют по длине из-за разного количества нуклеотидов, входящих в состав домена, а замены, возникающие в нем, обычно многочисленны и оказывают решающее значение на конформацию. В связи с этим не установлено точное количество шпилек (субдоменов – ES6a, ES6b, ES6c, ES6d (E23_1-E23_14)), отходящих от центральной множественной петли. На основе сравнительного анализа последовательностей генов 18S рРНК более чем 6000 видов эукариот был сделан вывод о том, что пространственная структура ES6^S сохраняется у большинства многоклеточных, и что, скорее всего, участок в среднем состоит из пяти шпилек и одной внутренней спирали (Gunnar, Odd, 2003). Безусловно, ES6^S – самая вариабельная структура среди 65 видов Digenea.

Субдомены ES6^S (ES6a, ES6b, ES6c, ES6c2 и ES6d) трематод имеют единый план строения, но конформационно отличаются друг от друга наличием внутренних и выпуклых петель внутри тела шпилек и различным числом нуклеотидов, входящих в состав булавочных головок. Эти структурные особенности являются уникальной чертой того или иного семейства Digenea. Исключение составляют семейства Echinostomatidae, Heterophyidae и Opisthorchiidae, систематика которых, по мнению большинства специалистов, требует ревизии (Olson et al., 2003; Thaenkham et al., 2012).

Несмотря на то, что все семейства трематод хорошо отличаются по ES6^S, с сохранением единой формы укладки, в нашем исследовании относительно этого домена все же возникли спорные вопросы, связанные с конформацией шпилек ES6b, ES6c1 и ES6c2. Как уже было отмечено, в центре ES6b находится множественная петля, от которой отходят три шпильки разной длины, образуя крестообразную структуру; мы не нумеровали эти шпильки, считая их единой частью ES6b, согласно концепции Армаче (Armache et al., 2010). У трематод шпилька ES6c двойная. Рядом с ES6c1 локализуется конформационно схожая, но

чуть меньшая по размеру ES6c2, что совсем не согласуется с данными исследований других эукариот, но, что и не противоречит общепринятому мнению относительно variability ES6^S в целом. Возможно, ES6c2 является дополнительным субдоменом типа ES6e (Armache et al., 2010; Taylor et al., 2009), а разделение субдомена ES6c у трематод имеет принципиально важное значение для фолдинга их 18S рРНК.

Мы обнаружили, что многочисленные замены внутри шпильки ES9^S сильно влияют на количество входящих в нее петель. Исследователи Acari отмечают, что в их выборке конформация ES9^S семейства Demodicidae была мало изменчива, и отличалась только у насекомых с полным превращением: *A. mellifera*, *D. melanogaster* и представителей семейства *Tetranychidae* (Gillespie et al., 2006; Zhao et al., 2013). По мнению этих авторов, спираль h41 представляет более важное значение для систематики. Наши результаты показали, что ES9^S и спираль h41 имели высокую степень variability, хотя нуклеотидных замен приходилось больше на ES9^S.

По нашим данным, домен ES12-h44 является наиболее консервативным из variability участков трематод. Действительно, области взаимодействия двух эукариотических рибосомных субъединиц на h44 (межсубъединичный мост между rpS17e (40S) и rpS24e (60S)) относят к областям с низкой степенью изменчивости. Интересным является тот факт, что нуклеотидные последовательности ES12^S, примыкающие к h44 у разных видов животных достаточно изменчивы, но с сохранением формы укладки вторичных структур (Maule et al., 2006; Armache et al., 2010; Mallatt et al., 2010; Qi, Kurt, 2016).

Ряд исследователей указывает на наличие в участках ES3^S и ES6^S консенсусных последовательностей, принимающих участие в формировании четвертичной структуры молекулы (Gunnar, Odd, 2003). Ими были выделены консенсусные последовательности для пшеницы (A²¹⁶AGGCUGAC²²⁴ в ES3^S и G⁸³⁹UUGGCCUU⁸⁴⁷ в ES6^S) и мышей (A²³¹AAACCAAC²³⁹ в ES3^S и G⁸⁹³UUGGUUUU⁹⁰¹ в ES6^S). Для всех остальных Metazoa был проведен анализ взаимодополняемости гомологичных последовательностей генов 18S рРНК,

показавший, что участки связывания в ES3^S и ES6^S достаточно консервативны. Основные отличия от консенсус-мотивов (AAAACCAAU для ES3^S и GUUGGUUUU для ES6^S) отмечались у *Cnidaria*, *Muxozoa*, *Nematoda*, и *Porifera*. Для большинства этих организмов максимальная длина предполагаемых участков взаимодействия была ограничена до 8 пар оснований. Мы попытались найти похожие последовательности. В доменах ES3^S и ES6^S они были абсолютно консервативны для трематод, A²¹⁷GAACCAAC²²⁵ и G⁹²⁶UUGGUUUU⁹³⁴ соответственно. Но мотив ES3^S отличается от мотива для пшеницы и мышей. В то же время мотивы в ES6^S были такими же, как у *Mus musculus*. Вероятно, это можно рассматривать, как молекулярную преадаптацию для паразитирования у теплокровных животных. Предположение находит косвенное подтверждение в результатах транскриптомных исследований трематод, например, прогнозируемые белки китайской печеночной двуустки *Clonorchis sinensis* обладают большей гомологией (20%) с белками млекопитающих (*Mus musculus* и *Homo sapiens*), чем с белками филогенетически более близкой почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* (15%) (цит. по Челомина, 2017).

Мы выявили еще одну интересную особенность – повышенный GC состав некоторых моделируемых регионов, в частности h27-ES7^S. В GC богатых районах эукариотического генома локализуется большое количество GpC островков, характеризующихся высоким содержанием гуанина и цитозина (более 60%), представленных в виде кластеров неметилированных GC боксов – локусов, родственных сайту узнавания некоторых транскрипционных факторов (Bird, 1986; Lindsay, Bird, 1987; Aissani, Bernardi, 1991). GpC островки имеются у всех генов, выполняющих базовые клеточные функции, и локализируются они преимущественно в их 5'- участках, а именно регуляторных, промоторных последовательностях и последовательностях первого экзона (Cooper et al., 1983). ES7^S является продолжением спирали h26, располагаясь на задней части плеча субъединицы 40S. Предположительно, с ES7^S связывается фактор инициации (ИФ) трансляции у эукариот (Demeshkina et al., 2000). Таким образом, ES7^S может играть определенную роль в узнавании или стабилизации некоторых из специфических

эукариотических ИФ. Содержание GC нуклеотидов в спиральных структурах было на порядок выше такового в петлях, а, как известно, именно спирали составляют каркас молекулы. На третичной структуре *T. aestivum* видно, что ES6^S (средний GC% больше 60) окружен плотным кольцом из белков, способствующих его фолдингу (Armache et al., 2010). Одна из шпилек ES6^S взаимодействует со шпилькой ES3^S, но значение этого взаимодействия пока не ясно. Стоит отметить, что в участках с высокой нуклеотидной изменчивостью GC-содержание оставалось низким (например, в h44-ES12^S или h16, h17). Возможно, таким образом, молекула проявляет лабильность и допускает накопление замен, в допустимых пределах, но без нарушения общей архитектоники (Dover, 1986; Hancock et al., 1988).

В нашем исследовании полноразмерная последовательность гена *nad1 N. schikhobalowi* не содержала вставок, делеций и стоп-кодонов, что указывало бы на ее нефункциональность (псевдоген или ядерная копия митохондриального гена) (Van Herwerden et al., 1999), и поэтому была пригодной для прогнозирования аминокислотной последовательности кодируемого им белка.

Для сравнения пространственной организации белковых молекул нами впервые были реконструированы 3D модели третичной структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы десяти разных видов трематод. Так как различия в использовании кодонов были минимальные, модели ожидаемо напоминали таковую для *N. schikhobalowi* (Приложение VIII). Видно, что белок слабо подвержен мутационным изменениям. Вероятнее всего это связано с тем, что NADH-дегидрогеназа является одним из ключевых белков дыхательной цепи и с нарушениями в функционировании первого дыхательного комплекса связаны некоторые митохондриальные заболевания (ряд нейропатий) (Zhu et al., 2016). Интересно и то, что большинство из выявленных мутаций в аминокислотных последовательностях *Nanophyetus* spp. оказались молчащими, но их влияние на клеточный метаболизм не исключается, так как есть свидетельства, что нуклеотидные замены в третьей позиции кодона могут изменять угол, при котором в растущую полипептидную цепь включается последующая аминокислота (цит. по: Челомина, 2017).

Изучение конформационных изменений биологических молекул посредством моделирования вторичных и третичных структур, как транскриптов рДНК, так и белков дыхательного комплекса, с привлечением высокотехнологичных данных электронной криомикроскопии может пролить свет на детали функционирования их комплексов. Моделирование трехмерных структур белковых молекул (мембранного комплекса, цитохромных, дыхательных, иммуноглобулинов, нейротрансмиттеров) эпидемиологически значимых трематод в последнее время набирает темпы и появляется все больше работ по этому направлению (Pakharukova et al., 2012; Akalesh et al., 2013; Swargiary, Akalesh, 2015; Zhu et al., 2016; Kim et al., 2017), являющемуся перспективным для медицинских исследований, в частности, разработки новых вакцин, антибиотиков и противогельминтных препаратов, которые могут связываться с мишенями 18S рРНК и ингибировать синтез белка у паразитов (Moazed, Noller, 1987; Zhu et al., 2016). Молекулярное моделирование привлекает внимание медиков-химиков. В настоящее время выбор безопасных и эффективных лекарств для лечения гельминтозов и большинства кишечных простейших ограничен, ни одно из соединений не охватывает весь спектр паразитов, и в основном они были разработаны десятилетия назад. Празиквантел, например, широко применяется для лечения трематодозов. Однако сообщалось, что это вещество проявляет низкую эффективность при лечении клонорхоза в северном Вьетнаме. Ким с соавторами полагает, что комплексное понимание устройства белков тегумента, в частности CsTegu20.6, посредством биомоделирования может быть использовано для разработки принципиально новых препаратов для борьбы с инвазией *C. sinensis* (Kim et al., 2017). Считается, что химиотерапевтические агенты прямо или косвенно влияют на ферментные системы гельминтов, в частности на фосфоенолпируваткарбоксикиназу (ФЕПКК), являющуюся ключевым ферментом, инициирующим глюконеогенный путь у животных, растений и бактерий. Эти пути сильно различаются у млекопитающих и гельминтов, что может быть использовано для обнаружения ингибиторов, избирательно влияющих на метаболизм паразитов (*Hymenolepis diminuta*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*,

Moniezia expansa, *Moniliformis dubius*). В отсутствие экспериментальных данных проводятся исследования трехмерных моделей белка ФЕПКК *S. japonicum* для лучшего понимания его структуры и функций, в перспективе использования как хорошего противогельминтного агента (Akalesh et al., 2013).

4.3. Филогения рода *Nanophyetus*

Преимущества 18S рДНК как филогенетического маркера (по сравнению с другими маркерами рибосомного кластера) неоспоримы, так как большинство спейсерных участков с трудом поддаются выравниванию, а ген 28S рРНК достаточно сложно секвенировать полностью (Coleman, 1997, 2003; Schultz et al., 2006; Selig et al., 2008).

Основываясь на сравнении последовательностей гена 18S рРНК трематод, в данной работе были реконструированы несколько типов иерархических филогенетических древ. Первое иллюстрирует внутривидовые филогенетические связи нанофьетусов (Рисунок 27А). Второе древо на несколько уровней выше и разрешает отношения между трематодами надсемейства Gorgoderoidea с достаточно высокими уровнями поддержки в узлах ветвления (Рисунок 30). На третьей филограмме на Рисунке 29 впервые для всего подотряда Xiphidiata показаны связи надсемейства Gorgoderoidea, включающего *Nanophyetus*, с четырьмя другими надсемействами трематод – Harporoidea, Allocreadioidea, Plagiorchiidae, Microphalloidea, входящими в этот подотряд. Настоящий анализ в целом подтвердил результаты Олсона с соавторами в отношении состава и взаимосвязей основных групп Plagiorchioidea и Microphalloidea, а также вывод, что они принадлежат к коронным группам дигенетических сосальщиков (Olson et al., 2003). С другой стороны, включение нами большего числа новых полных или почти полноразмерных последовательностей (78 последовательностей размером 1890 п.н.) в текущий анализ, по сравнению с работой Олсона, основанной на сравнении неполных последовательностей гена 18S рРНК длиной 1668 п.н. для 75 видов всего подкласса дигеней, выявило некоторые взаимосвязи, которые ранее не рассматривались, прежде всего – порядок ветвления и статистическая поддержка

монофилетичности, а также датировки основных дивергентных событий. Субклады внутри Gorgoderoidea, в том числе, содержащие рода *Nanophyetus* и *Paragonimus*, имеют высокие индексы поддержки в узлах ветвления. Единственный вид *Allocreadium neotenicum* (надсемейство Allocreadioidea) оказался внутри Gorgoderoidea. Теоретически изменение размера выборки и еще большее увеличение длины последовательностей могло бы разрешить эту проблему. Хоудхури с соавторами таким образом определили положение аллокреадид на общем филогенетическом древе, построенном для отряда Plagiorchiida, взяв за основу выборку Олсона и добавив к ней дополнительно три вида из семейства Allocreadiidae Looss, 1902; в общей сложности получилось 78 последовательностей длиной 1627 п.н. (Choudhury et al., 2007). В их исследовании поднимаются вопросы о составе надсемейства Allocreadioidea и взаимоотношениях семейства Allocreadiidae с другими семействами, находящимися в его составе (в частности Opescoelidae). Примечательно, что они показали, что клада Allocreadiidae вместе с сестринской Callodistomidae тесно связана с Gorgoderidae, что, как сообщают авторы, подтверждается некоторыми аспектами биологии горгодерид. Представители обоих семейств распространены в пресноводных водоемах, и являются паразитами главным образом рыб, хотя некоторые из них паразитируют также у амфибий. Подобно аллокреадидам, горгодериды используют двустворчатых моллюсков, а не брюхоногих, как первых промежуточных хозяев. Отмечено также сходство между экскреторными пузырями церкарий аллокреадид и горгодерид. Более того, на основании сперматологических данных, ультраструктурного анализа сперматозоидов трематод ряд исследователей предлагает рассматривать семейство Allocreadiidae в составе надсемейства Gorgoderoidea (Bakhoum et al., 2017).

В целом полученные нами данные по маркеру 18S рДНК указывают на эволюционную молодость нанофиетусов, их тесные филогенетические связи с парагонимидами (легочными сосальщиками) и свидетельствуют в пользу использования полноразмерных последовательностей для филогенетических реконструкций. Так, некоторая неразрешенность в топологии прослеживается на

древе 28S рДНК, построенном на основе усеченного гена (Рисунок 27В), где *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* находились в составе одной ветви. Ген 28S рРНК имеет очень консервативный характер с медленной скоростью мутаций, так что дивергирует гораздо позже других членов семейства рибосомных генов. При использовании полноразмерной последовательности данного гена (Рисунок 27Б), задача успешно решалась, и таксономическая структура приобретала свой нормальный вид. Это еще раз подтверждает тот факт, что для молекулярно-генетического анализа лучше использовать последовательности максимальной длины.

Современные филогенетические древа – это гораздо больше, чем просто хорошо поддержанная топология. Опираясь на построенную в BEAST хронограмму, удастся проследить направление эволюции печеночных и кишечных трематод одновременно с изменениями вторичных структур наиболее переменных участков их 18S рРНК, и жизненных циклов (Рисунок 31). На хронограмме видно, что подотряды Echinostomata, Xiphidiata, Pronocephalata и Opisthorchiata разделились около 90 – 125 млн.л.н., в меловой период, самый продолжительный из периодов мезозойской эры. Возраст соотносится с датировкой обнаружения яиц трематод в копролитах гигантских ящеров, находящихся, как известно, в этот период на пике своего расцвета (Poinar, Voucot, 2016). В меловом периоде плацентарные млекопитающие разделились на несколько групп: копытных, насекомоядных, хищников и приматов, появились настоящие птицы. Нишу крупных хищников в водоемах занимали рептилии, с сопоставимым по отношению к теплокровным, уровнем обмена веществ. Возникло небывалое разнообразие хозяев для трематод. Представители подотряда Echinostomata оказались несколько древнее – 30 – 60 млн.л.н., чем семейства из подотрядов Opisthorchiata – 30 млн.л.н. и, в особенности, Xiphidiata – 10 млн.л.н., представители которого предположительно быстрее освоили все возможные экологические ниши в паразитарных сообществах. Сначала дигенетические сосальщики заселили кишечник птиц, а потом печень и кишечник млекопитающих, с постепенной сменой второго промежуточного хозяина – моллюска (примерно 45

млн. л.н., по нашей выборке впервые у *P. gralli*) на рыб (примерно 25 – 30 млн. л.н., рода *Echinochasmus*, *Drepanocephalus*), как более перспективных переносчиков трематодозной инфекции. Что касается подотрядов Opisthorchiata (семейств Opisthorchiidae, Heterophyidae), и Xiphidiata (семейств Paragonimidae и Troglotrematidae), то здесь наблюдается некоторый параллелизм в инфицировании паренхиматозных органов и кишечника, несмотря на таксономическую удаленность этих систематических групп. Освоение окончательных хозяев представителями этих подотрядов началось в периоды палеоген-неоген (2,58 – 30 млн.л.н.), когда общий вид фауны млекопитающих постепенно начал приобретать вид, приближенный к современному, с сужением спектра потенциально незараженных окончательных хозяев. При этом вторичные структуры ES6^S и ES9^S за все время дивергентной эволюции трематод, т.е. за миллионы лет, не изменили своей общей архитектуры. У троглотрематид, самые молодые виды рода *Nanophyetus* разделились 2,5 млн.л.н., во всех вторичных структурах, за исключением h16, h17 и h44-ES12^S, имелись уникальные модели доменов и спиралей. Интересно, что печеночные и легочные трематоды характеризуются различными конформациями ES3с. Фолдинг ES7^S печеночных и легочных трематод также отличается, в то время как кишечные трематоды имеют все варианты укладки, а представители семейства Notocotilidae (древняя филогенетическая ветвь, занимающая базальное положение на древе) – уникальную вторичную структуру. Все это может говорить о том, что эволюция вторичных структур 18S у трематод продолжается, хоть и движется медленными темпами, и возможно связана с приобретением новых адаптаций. Паразитарная система в целом очень лабильна и легко приспосабливается к постоянно изменяющимся условиям среды. На сегодняшний день ни одна группа паразитических червей не расселилась так широко по организму животного, как трематоды, и, пожалуй, ни у одной другой группы паразитических червей нет таких многочисленных и сложных приспособлений к существованию в столь разнообразных условиях.

4.4. Филогеография и демографическая история популяций *Nanophyetus*

Ядерные и митохондриальные ДНК маркёры широко применяют для выявления родственных взаимосвязей между отдельными особями или группами особей, для изучения динамики генетических процессов, миграции, изоляции в популяциях, описания истории возникновения вида (Avice, 2000). Филогеографический анализ, основанный на данных генетического разнообразия современных популяций, проясняет процессы, детерминирующие географическое распределение генеалогических линий (Avice, 2000). Для паразитов, филогеографические данные полезны для понимания миграционных путей и истории колонизации видов, установления источников и времени инвазии, а также для оценки их лекарственной устойчивости в местах интродукции (Vilas et al., 2005). Тем не менее, филогеография паразитов остается мало изученной; немногочисленные исследования проведены на отдельных видах нематод, цестод и трематод (например, Iwagami et al., 2000; Wickstrom et al., 2003; Nieberding et al., 2004; Semyenova et al., 2006; Attwood et al., 2008; Ichikawa et al., 2011; Chelomina et al., 2014).

Из-за особого образа жизни популяции паразитов испытывают в ходе своей эволюции различные демографические изменения, которые отражены в их современном генофонде. Они могут испытывать фрагментацию ареалов и/или колебания численности. Генетическая изменчивость паразитов и появление возможных специфических для хозяев линий могут быть отпечатком прошлого аллопатрического видообразования. Способность обнаруживать такие прошлые демографические процессы является важной предпосылкой для тщательной оценки распределения генетической изменчивости среди популяций паразитов (Bouzid et al., 2008).

Минимальное спеннинговое древо (древо минимальной протяженности) для рода *Nanophyetus* указывает на глубокий филогенетический разрыв между региональными популяциями. На таких высоких филогенетических уровнях географически изолированные линии расходятся из-за физической изоляции и,

таким образом, могут адаптироваться к местной фауне хозяев (Bouzid et al., 2008). У нанофиетусов спектр хозяев (промежуточных и дефинитивных) существенно отличается (Рисунок 49). Например, *N. salmincola* и *N. japonensis* в качестве вторых промежуточных хозяев в отличие от *N. schikhobalowi* помимо рыб, могут использовать саламандр, однако по составу дефинитивных хозяев *N. schikhobalowi* более близок к *N. japonensis*. Так, только у *N. salmincola* основными хозяевами могут становиться птицы (большая голубая цапля, хохлатый крохаль, пегий зимородок). Все это может свидетельствовать о долговременной и глубокой эволюционной адаптации видов к разным условиям существования, и также находит отражение в особенностях демографических историй региональных популяций, общим для которых является отсутствие бутылочного горлышка в недавнем прошлом. Популяции, которые подвергаются быстрой экспансии или экспоненциальному росту, характеризуются гладким унимодальным распределением попарных генетических расстояний (Rogers, Harpending, 1992), что мы наблюдаем у каждого вида нанофиетусов. Напротив, пик в области 0 – 1 (L-образная кривая) является индикатором события недавнего бутылочного горлышка (Excoffier et al., 2005). Популяции обычно подвергаются пространственной экспансии, если изначально ее ареал был сильно ограничен, а затем увеличился. В случае всех трех видов нанофиетусов пространственная экспансия предшествовала демографической.

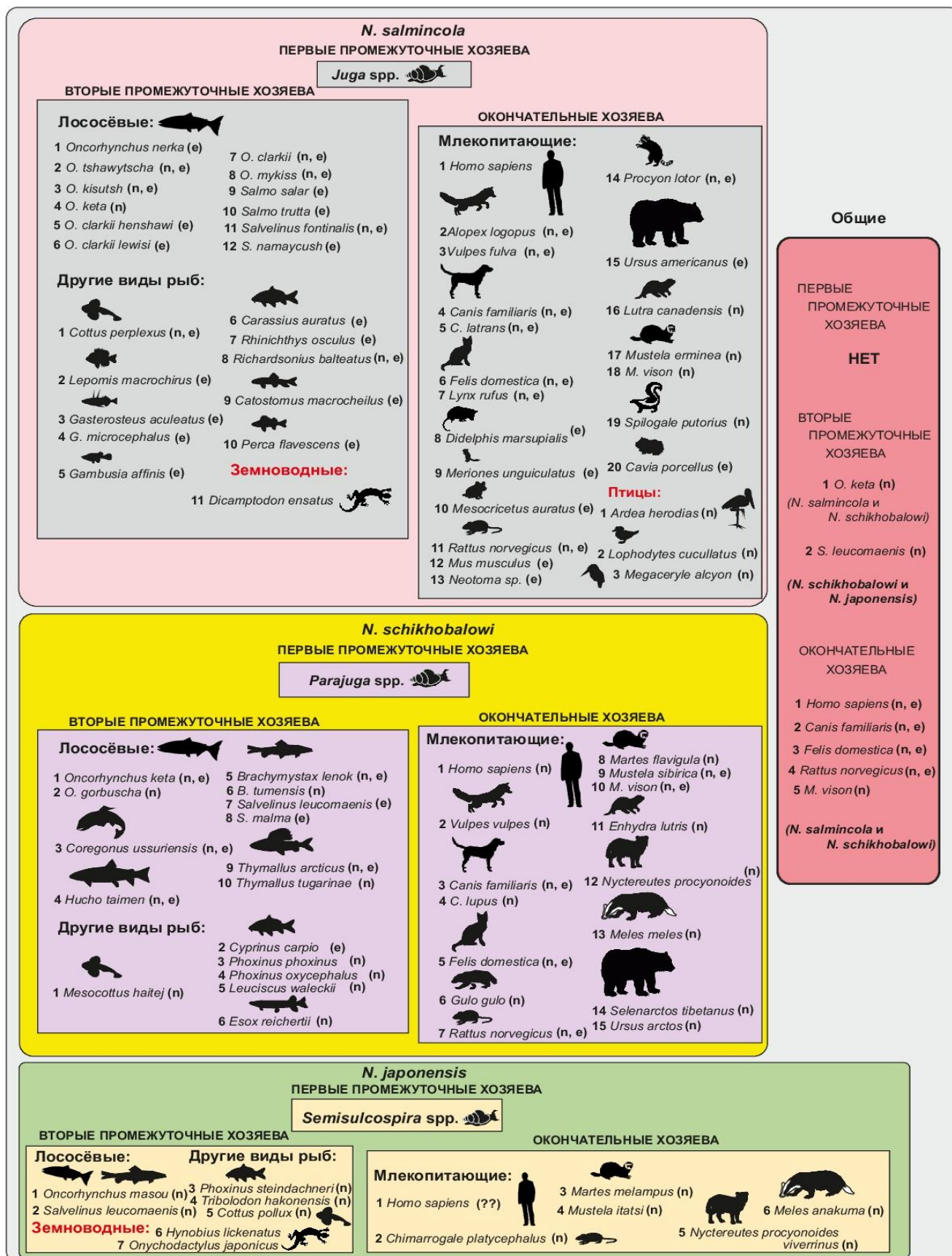


Рисунок 49 – Виды рода *Nanophyetus* и их промежуточные и окончательные хозяева. (n) – инфекция, зарегистрированная в природе, (e) – экспериментально полученное заражение (Филимонова, 1963, 1964, 1965; Millemann, Knapp, 1970; Saito et al., 1982; Старобогатов и др., 2004; Strong et al., 2011).

Филогенетическая структурированность (проиллюстрированная как на древе минимальной протяженности, так и медианных сетях) и датировки основных популяционных событий для видов разные. Гаплотипические связи *N. salmincola* напоминают звезднообразную филогению, которая обычно объясняется быстрой популяционной экспансией после события бутылочного горлышка (Hudson et al., 1992). Филогенетическая структура гаплотипов *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* демонстрирует более разветвленные сети, характерные для популяций с относительно отдаленным временем последней демографической экспансии. Разная глубина филогеографического разрыва у близкородственных видов, имеющих некоторые отличия в экологических предпочтениях, предполагает существование разных региональных рефугиумов и различные способы выживания во время четвертичных оледенений/ похолоданий (Michaux et al., 2005).

Согласно полученным данным, демографический рост популяций *N. schikhobalowi* произошел в среднем плейстоцене, в эпоху Тобольского (400 – 250 тыс. лет назад) межледниковья Западной Сибири. Однако аналогичные события в популяциях *N. salmincola* и *N. japonensis* больше соответствуют среднеплейстоценовому Ширтинскому (190 – 180 тыс. лет назад) межледниковью в России, соответствующему Ярмутскому межледниковью в Северной Америке. Более ранние датировки, полученные для *N. schikhobalowi* могут быть связаны с различиями палеоклиматов на разных континентах. Из-за муссонов климатические флуктуации в Азии в период плейстоцена не были столь значительными, как в Европе и Северной Америке, хотя холодный сухой климат привел к исчезновению многих видов (Hewitt, 2004; Wang et al., 2006). Необходимо отметить, что ошибки, ассоциированные с мутационными скоростями, обычно большие, поэтому время, установленное по молекулярным часам, довольно приблизительное (Arbogast et al., 2002). Молекулярные часы применяются при изучении таксонов разного таксономического ранга, хотя их использование в популяционных исследованиях постоянно дискутируется (Emerson, Hickerson, 2015).

Филогенетический тест относительных скоростей (relative rate test) показал, что последовательности сравниваемых видов эволюционируют примерно с

одинаковыми скоростями ($Z < 1,96$; $p=0,05$). Поэтому данные изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК подходят для датировки исторических событий внутри каждой филогеографической группы. Для получения точных датировок необходима калибровка по независимым данным, например, палеонтологическим, геологическим, или молекулярно-генетическим (древняя ДНК). Так, например, Этвуд с соавторами для вычисления времени дивергенции шистосом брали калибровочную точку в $5 \pm 0,1$ млн. лет, что соответствовало второму крупному гималайскому горообразованию, способствовавшему отделению центральноазиатских видов от восточных (Attwood et al., 2008). Палеонтологические находки для плоских червей неизвестны, но в капролитах и древних захоронениях сохранились яйца некоторых видов (Poinar, Voucot, 2016). Именно эти данные были использованы в настоящей работе в качестве калибровочных точек.

В составе MST древа *N. schikhobalowi* удастся выделить три основные филогруппы: две для рек Комиссаровка и Илистая, и одну – для реки Павловка. Примечательно, что демографические истории филогрупп сильно отличаются. *L3* представляет единственную популяционную группу со стабильной численностью. *L1* характеризуется самым ранним началом как пространственной, так и демографической экспансии и именно в составе ее центральной структуры находится гаплотип, связывающий региональные популяции *N. salmincola* и *N. schikhobalowi*. *L2* представлена исключительно гаплотипами нанофиетусов из Павловки (приток Уссури), один из которых образует связь с популяцией *N. japonensis*. Эти результаты являются генетическими свидетельствами древних событий формирования географической изоляции нанофиетусов и связанного с ней видообразования.

У свободноживущих видов, наличие различных филогенетических линий предполагает изоляцию их популяций в различных рефугиумах (и может быть связано с биографическими барьерами), где происходила диверсификация генетических линий видов (Avice, 2000). В среднем плейстоцене на юге российского Дальнего Востока происходили значительные изменения в речных

системах (отчасти из-за вулканической активности), что могло повлиять на структуру популяции *N. schikhobalowi*. Наличие двух филогенетических линий с разными демографическими историями для рек Илистая и Комиссаровка может указывать либо на двухэтапную инвазию, либо на существование двух предковых рефугиумов для этих речных систем.

Исследование демографической истории обычно включает определение значений эффективного размера популяции во временных интервалах на протяжении всего периода эволюции от одного общего предка. В последнее время для реконструкции динамики численности природных популяций различных видов широкое распространение получил метод байесовских контурных диаграмм (Drummond et al., 2005), обычно использующий данные генетической изменчивости митохондриальной или хлоропластной ДНК. Считается, что положительные, отрицательные и нулевые значения на диаграммах свидетельствуют об увеличении, снижении или неизменности эффективного размера популяции соответственно (Griffiths, Tavaré, 1994). Анализ байесовских контурных диаграмм со средним и медианным значением NeT демонстрирует наличие общего тренда развития популяций нанофиетусов (Рисунки 31, 32, 33). Однако генетические потери видов с момента разделения основных филогенетических линий разные. Наиболее уязвимой оказалась популяция *N. japonensis*, у которой эффективный размер популяций так и остался в области пониженных значений. В популяции *N. schikhobalowi* снижение эффективной численности остановилось лишь в позднем плейстоцене (30 – 20 тыс. лет назад), когда она перешла в состояние стабильности. И только популяция *N. salmincola* успешно прошла данный временной диапазон без потери эффективной численности. Интересно, что по временным параметрам стабилизация численности нанофиетусов совпадает с периодом начала резкого роста популяций кеты в голоцене (общего второго промежуточного хозяина *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*), продолжающегося и по настоящее время (Маляр, 2017).

Анализ соотношения параметров генного и нуклеотидного разнообразия также позволяет исследовать особенности демографической истории популяций и

делать предположения о демографических событиях прошлого (Avisе, 2000). Так, высокие значения обоих параметров отражают высокую численность популяции и широкий ареал; высокое генное и более низкое нуклеотидное разнообразие (что в большей мере соответствует данным по нанофиетусам) являются результатом длительной изоляции популяции при относительно низкой численности, а низкие значения обоих параметров свидетельствуют о том, что данная популяция произошла от предковой популяции с низкой эффективной численностью, пережившей период депрессии численности (Avisе, 2000; Painter et al., 2007).

Популяция нанофиетусов, выделенная из ленков, пережила события пространственной экспансии и демографического роста раньше, чем популяция нанофиетусов из гольянов (т.е. могла быть древнее). Обе сравниваемые популяционные выборки были хорошо дифференцированы по частоте гаплотипов, что может являться следствием глубокой локальной адаптации паразитов к среде обитания, гидрологическим, температурным режимам и промежуточным хозяевам. Изучение совместной с хозяином коэволюции представляет большой интерес. Паразитические черви чрезвычайно разнообразны в отношении их специфичности к хозяевам, а специфичность любого паразита является надежным показателем генетической дифференциации (Cribb et al., 2001; Корсуненко, 2010). Согласно второму правилу Мантера (англ. *Manter's second rule*), чем дольше длится ассоциация паразита с хозяином, тем больше специфичных черт наблюдается в паразитической группе (Cribb et al., 2001). К примеру, у пяти видов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* и *Bilharziella*, обитающих на территории России и бывших союзных республик, обнаружена сложная филогеографическая структура, отражающая незавершенные процессы сортировки линий мтДНК и рДНК при расселении и адаптации паразита к разным видам промежуточных хозяев-моллюсков (Лопаткин и др., 2011).

В результате ряда исследований было выяснено, что в процессе эволюции сначала заразились трематодами брюхоногие моллюски, а инфицирование полихет, лопатоногих и двустворчатых моллюсков произошло в результате смены хозяев

(англ. host-switching). Однако паразиты незаслуженно игнорируются в научной литературе касательно процессов эволюции и видообразования (Huysse et al., 2005).

Дело в том, что иногда бывает трудно различить эволюционные сценарии. Например, два паразитирующих сестринских таксона, обнаруженные у одного хозяина, могут возникнуть либо путем симпатрического видообразования, либо аллопатрического в географически изолированных популяциях хозяев, но с последующими вторичными контактами (Huysse et al., 2005). Основная проблема заключается в том, что современное географическое распределение вида не обязательно является надежным показателем его исторически сложившегося географического ареала, поскольку географический диапазон видов может значительно меняться в течение коротких периодов времени (например, постледниковая экспансия). На эти макроэволюционные тенденции влияют особенности жизнедеятельности, как хозяина, так и паразита, такие как специфичность и мобильность. Например, небольшой эффективный размер популяции (N_e) и вертикальный перенос генов могут инициировать видообразование эффекта-основателя, тогда как естественный отбор может вызвать либо адаптивное, либо экологическое видообразование у видов паразитов с большим N_e (Huysse et al., 2005). Здесь мы приводим данные, исключая концепцию ретикулярной, или сетчатой, эволюции нанофиетусов, потому что данные по ядерной и митохондриальной ДНК хорошо совпадают. Более того известно, что озеро Ханка, являющееся бассейном рек Комиссаровки и Илистой, играет важнейшую роль в гнездовании и сезонной миграции птиц, в том числе из Северной Америки. Так как *N. salmincola* может паразитировать у утиных (Рисунок 49), теоретически, не исключается вероятность занесения трематодозной инфекции на Дальний Восток или с Дальнего Востока в Северную Америку через предковую форму нанофиетусов. Поскольку экологические факторы, которые формируют микроэволюционные закономерности, могут также способствовать долгосрочным макроэволюционным тенденциям, мы фокусируемся на истории жизни паразитов-нанофиетусов и их популяционную динамику.

В большинстве изученных на сегодняшний день паразито-хозяинных ассоциаций филогенетическая конгруэнция несовершенна. Филогенетические древа обеспечивают косвенную датировку событий, которые привели к существованию современных видов. Межвидовые филогении не могут строго проверить альтернативные гипотезы относительно географии видообразования. Оптимальным статистическим методом будет согласование филогенетических древ хозяина и паразита. Построенные в BEAST древа для одновременной оценки времени дивергенции рыб и трематод показывают (Рисунок 39), что видообразование нанофиетусов и их хозяев совпадает (Philippe, Laurent, 1998; Nieberding et al., 2004), т.е. возможно ко-видообразование. Вопрос, было ли видообразование нанофиетусов алло- или симпатрическим остается открытым. Вместе с тем, весьма вероятно, что у нанофиетусов были реализованы различные механизмы видообразования, поскольку у *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* генетические различия пропорциональны географическим дистанциям и времени изоляции (Северная Америка и Евразия разделились раньше, чем образовались Японские острова: 80 млн. лет назад и 30 млн. лет назад соответственно), но не согласуются с морфологическими различиями. В то же время, *N. japonensis* морфологически хорошо дифференцирован с обоими видами, но генетически ближе к *N. schikhobalowi*. По морфологии *N. japonensis* отличается от *N. salmincola* и *N. schikhobalowi* тем, что задний конец тела конический, а не округлый, семенники диагональные, а не симметричные; ветви кишечника расположены латерально на уровне семенников или перекрывают их вместо медиального расположения на стадии мариты; у метацеркария ротовая присоска больше, чем брюшная (Saito et al., 1982). Это контрастирует с данными по *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*, которые имеют высокое морфологическое сходство. Тем не менее, показатели дивергенции двух последних видов значительно выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании 133 нуклеотидных последовательности генов и спейсерных областей рибосомного кластера ядерного генома и нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК кишечных трематод рода *Nanophyetus* (*N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola*) были определены, депонированы в международную базу данных GenBank и проанализированы совместно с 257 доступными последовательностями ДНК трематод. Реконструированы вторичные структуры рДНК транскриптов, а также вторичные и третичные структуры первой субъединицы NADH-дегидрогеназы. Показаны отличия в генетической изменчивости видов, дополнительно подтвержденные их демографическими структурами, выявленными с использованием статистических данных, а также с помощью коалесцентного подхода. С помощью филогенетических реконструкций, позиционировано положение видов на разных иерархических уровнях: род, надсемейство, отряд. По совокупности полученных данных восстановлен видовой статус *N. schikhobalowi* и подтвержден статус видов для *N. japonensis* и *N. salmincola*. В ходе анализа внутривидовой изменчивости *N. schikhobalowi* были обнаружены географические и хозяиноспецифические особенности, указывающие, что не только география, но и смена хозяина являются важными факторами, структурирующими популяции паразита. Результаты последних лет подтверждают роль промежуточных хозяев в качестве накопителя генетического разнообразия трематод в ходе онтогенеза (Sures, 2004). Поскольку коэволюционные взаимодействия могут сильно расходиться во времени и пространстве, важно количественно оценить и сравнить филогенетические вариации, как хозяина, так и паразита в их географическом диапазоне. Связь между такими микроэволюционными и макроэволюционными событиями плохо изучена. В настоящем исследовании мы попытались связать два этих процесса, лежащих в основе диверсификации трематод. В следующих исследованиях необходимо увеличение количества выборок, как трематод, так и их хозяев, а также расширение круга молекулярных маркеров для получения дополнительной информации о генетической структуре популяций нанофьетуса.

Анализ всех, полученных нами результатов в совокупности с данными научной литературы позволяет оценить влияние ряда факторов на появление и циркуляцию возбудителя нанофиетоза на территории Приморского края и выявить причины становления и устойчивого поддержания очагов распространения паразитарной инфекции. По пути миграции инфицированных моллюсков существовали условия для поддержания замкнутого жизненного цикла, т.е. для существования биотопов промежуточных и окончательных хозяев нанофиетусов. К примеру, на о. Сахалин и Камчатке нет условий для паразитирования *Nanophyetus*, так как температура воды слишком низкая для жизни моллюсков. Температура воды в период хода рыбы колеблется в северных реках (р. Тымь) от 6 до 11°, в южных (р. Поронай) – 10 – 15°C, а средняя температура воды в реках Приморского и Хабаровского краев составляет 17,6°C.

Циркуляция возбудителя реализуется именно в тех водоемах, в которых обитают моллюски рода *Parajuga*, являющиеся промежуточными хозяевами *N. schikhobalowi*. Поддержание высокой численности трематод возможно только за счет суперинвазии лососевых. Интенсивность инвазии Salmonidae исключительно важна для существования нанофиетуса, поскольку это в той или иной степени может гарантировать персистирование инфекции по устойчивой пищевой цепи «рыбы-млекопитающие», что представляется особенно важным, с учетом того, что питание рыбой дефинитивных хозяев носит эпизодический характер, и срок жизни трематод непродолжителен (Беспрозванных, Ермоленко, 2005).

По мнению В.В. Беспрозванных и А.В. Ермоленко (2005), там, где из-за антропогенного воздействия лососевые рыбы исчезают (р. Амур, р. Одарка, притоки р. Раздольной, р. Комиссаровка, р. Илистая), роль вторых промежуточных хозяев могут взять рыбы иной систематической принадлежности (карповые, щуковые и др.), но индекс инфицированности их не высок, и метацеркарии характеризуются меньшими размерами. Мы предполагаем, что заразились впервые нанофиетозом лососевые рыбы, а затем инфекцию переняли карповые. Карповые рыбы оказались восприимчивы к трематодозу, и последующая иррадиация пошла

быстрыми темпами. Это согласуется с гипотезой Красной Королевы (Red Queen hypothesis: Van Valen, 1973; Curtis, Lively, 2010), в которой говорится, что взаимодействие паразитов и их хозяев ведет к постоянному естественному отбору для адаптации и контрадаптации и способствует пространственной мозаичности. Каждый из них постоянно должен «быть настороже», чтобы не погибнуть и оставаться приспособленными к условиям своей среды обитания. В данной работе мы показали, что эволюция трематод сопровождалась освоением новых экологических ниш с разными уровнями интенсивности метаболизма.

ВЫВОДЫ

1. Генетические расстояния между популяциями *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* достигли межвидовых значений для трематод, общие риботипы отсутствуют, сортировка митохондриальных линий завершена, что позволяет считать их самостоятельными зоологическими видами.

2. Уровни генетического разнообразия *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* сопоставимы между собой и выше, чем у *N. salmincola*; уровни генетической дифференциации видов по данным ядерных и митохондриальных маркеров коррелируют с географическими дистанциями, но не согласуются с уровнями морфологических отличий, что может быть свидетельством реализации различных механизмов видообразования при диверсификации рода *Nanophyetus*.

3. Локальные популяции *N. schikhobalowi* из разных речных систем и видов рыб-хозяев отличаются уровнем генетической изменчивости, характером распределения нуклеотидных замен в последовательностях гена *nad1* мтДНК и ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, рибо- и гаплотипическим составом, а также демографическими историями. Выявленное ограничение генных потоков в совокупности с перечисленными различиями исключает их полную панмиксию и может быть свидетельством микроэволюционной адаптации паразита к смене хозяина.

4. Демографические истории региональных (видовых) популяций отличаются и не имеют свидетельств недавних событий бутылочного горлышка. Демографическая экспансия и обособление основных генеалогических линий датируется разными периодами среднего плейстоцена: примерно 380 и 250, 225 и 175, а также 195 и 110 тыс. лет назад у *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно.

5. Сеть гаплотипов мтДНК *N. schikhobalowi* представлена тремя основными филогенетическими линиями, имеющими разные предковые гаплотипы, демографические истории и географическое распределение, что

предполагает неоднократное заселение исследованных речных систем из различных плейстоценовых рефугиумов.

6. Филогенетический анализ митохондриальных генов с молекулярной датировкой межвидовой дифференциации обнаружил временное совпадение дивергентной эволюции видов *Nanophyetus* и их основных промежуточных хозяев – лососевых рыб, допускающее возможность ко-видообразования.

7. Согласно результатам молекулярной датировки, основанной на данных филогенетического анализа генов 18S рДНК, возраст рода *Nanophyetus* составляет около 5 млн. лет, разделение подотрядов Xiphidiata и Opisthorchiata произошло около 70 млн., а их дивергенция с подотрядами Echinostomata и Pronoccephalata – примерно 100 млн. лет назад.

8. Вторичные структуры спейсерных областей (ITS1 и ITS2) рДНК при сохранении общего принципа укладки (т.е. древовидной конформации для ITS1 и ладони с четырьмя пальцами для ITS2), уникальны для каждого вида *Nanophyetus*; они содержат консервативные для эукариот структурные мотивы, а также мотивы теломерных и регуляторных (промоторы, энхансеры) повторов, локализация которых более постоянна в ITS2.

9. Вторичные структуры переменных доменов и спиралей 18S рРНК трематод по сравнению с другими эукариотами отличаются крестообразной формой ES6b, наличием дополнительной укороченной спирали ES6c и удлиненными спиралями ES6a и h39. Формы укладки доменов ES6^S и ES9^S семействоспецифичны, что позволяет рекомендовать их для баркодинга.

10. Вторичная структура прогнозированной аминокислотной последовательности первой субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса *N. schikhobalowi* организована из восьми трансмембранных спиралей, соединенных девятью петлями; третичная («ленточная») структура имеет сферическую форму с сайтами связывания из семи аминокислотных остатков в центральной области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 2. С. 307 – 331.
2. Беспрозванных В.В. Фауна, биология, экология партенит и церкарий трематод моллюсков рода *Juga* (Pachychilidae) из рек Приморского края. Владивосток: Дальнаука. 2000. – 121 с.
3. Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В. Природноочаговые гельминтозы человека в Приморском крае. Владивосток: Дальнаука. 2005. – 120 с.
4. Беэр С.А., Булат С.А. Исследование полиморфизма геномной днк трематод в разных фазах развития // Паразитология. 1998. Т. 32, № 3. С. 213 – 220.
5. Беэр С.А., Воронин М.В. Биология возбудителей шистосомозов / Под ред. С.О. Мовсисян. М.: Т-во научных изданий КМК. 2011. – 200 с.
6. Брусенцов И.И., Брусенцова И.В., Катохин А.В., Беспрозванных В.В., Семенченко Н.Н., Сазонов А.Э., Мордвинов В.А. Популяционно-генетический анализ и филогеография китайского печеночного сосальщика (*Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875) на территории России // Клеточная биология и генетика. 2013. № 3. С. 91 – 99.
7. Буланова Н.В., Сынзыныс Б.И., Козьмин Г.В. Алюминий индуцирует аберрации хромосом в клетках корневой меристемы пшеницы // Генетика. 2001. Т. 37, №12. С. 1725 – 1728.
8. Буторина Т.Е., Бусарова О.Ю., Ермоленко А.В. Паразиты гольцов (Salmonidae: Salvelinus) Голарктики – Владивосток: Дальнаука. 2011. – 281 с.
9. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Биофизика. 1992. Т. 29. С. 3 – 250.
10. Воронова А.Н., Челомина Г.Н. Высокая дивергенция двух морфологически близких видов трематод рода *Nanophyetus* лососевых рыб по данным последовательностей гена *nad1* мтДНК // Биология моря. 2018. Т. 44. С. 115 – 119.

11. Гинецинская Т.А. Жизненные циклы и биология личиночных стадий паразитических червей рыб // Основные проблемы паразитологии рыб. 1958. С. 144 – 188.
12. Гинецинская Т.А., Добровольский А.А. Частная паразитология. Паразитические черви, Моллюски и Членистоногие: Учеб. пособие для биолог. спец. вузов/ Под ред. Ю.И. Полянского. М.: Высш. Школа. 1978. – 292 с.
13. Гопко М.В., Михеев В.Н. Паразитические манипуляции фенотипом хозяина: эффекты во внутренней и внешней среде // Журнал общей биологии. 2017. Т. 78, № 6. С. 16 – 48.
14. Драгомерецкая А. Г. Экологические и социальные основы функционирования очагов нанофиедоза в условиях Приамурья: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2015. – 24 с.
15. Драгомерецкая А.Г. Зеля О.П., Иванова И.Б. и др. Трематодозы Приамурья: рыба как фактор передачи гельминтов человеку. Информационно-методическое письмо. Хабаровск: Библиотека инфекционной патологии. Выпуск 32. 2012. – 48 с.
16. Драгомерецкая А.Г., Зеля О.П., Троценко О.Е. Оценка инвазированности лососеобразных рыб метацеркариями *Nanophyetus salmincola schikhobalowi* (Skrjabin et Podjapolskaja, 1931) в реках Хабаровского края // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2014. №3. С. 25 – 29. (а)
17. Драгомерецкая А.Г., Зеля О.П., Троценко О.Е., Иванова И.Б. Социальные факторы функционирования очагов нанофиедоза в Приамурье // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2014. №4. С. 23 – 28. (б)
18. Катохин А.В. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felinus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям // Доклады академии наук. Т. 421. 2008. С. 549 – 552.
19. Корсуненко А.В. Геномная вариабельность трематод (Trematoda) на стадии промежуточного хозяина - моллюска: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2010. – 24 с.
20. Ленинджер А. Биохимия. Т. 1 – 3. Москва: Мир. 1985. – 367 с.

21. Лопаткин А.А. Изучение особенностей молекулярной эволюции птичьих шистосом (Trematoda: Schistosomatidae): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2011. – 27 с.
22. Лопаткин А.А., Хрисанфова Г.Г., Воронин М.В., Зазорнова О.П., Беэр С.А., Семенова С.К. Полиморфизм гена *cox1* церкариальных изолятов птичьих шистосом (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae), собранных в водоемах Москвы и Московской области // Генетика. Т. 46. 2010. С. 981 – 989.
23. Маляр В.В. Сравнительная филогеография четырех видов рыб семейств Salmonidae и Cyprinidae в Японском и Охотском морях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 2017. – 26 с.
24. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2. Москва: Мир. 1993. – 415 с.
25. Мишаков Н.Е. Дополнительные хозяева нанофиетуса в Приморском крае // Труды Биологического почвенного института. Том II. 1972. С. 236 – 244. (а)
26. Мишаков Н.Е. Симптоматология нанофиетоза // Труды Биологического почвенного института. Том II. 1972. С. 256 – 272. (б)
27. Мишаков Н.Е. Методы лечения больных нанофиетозом и их эффективность // Труды Биологического почвенного института. Том II. 1972. С. 273 – 278. (в)
28. Мишаков Н.Е. Нанофиетоз человека в Приморском крае: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва. 1970. – 26 с.
29. Сериков М.А., Зенкова Р.Н., Власов В.В. Природные РНК: Механизмы специфического узнавания и взаимодействия // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 2. С. 274 – 284.
30. Синович Л.И., Востриков Л.А. Трематодозы Дальнего Востока (методические рекомендации). Хабаровск. 1974. – 44 с.
31. Скрябин К.И. Трематодозы человека и животных. Изд-во АН СССР. 1979. – 197 с.

32. Старобогатов Я.И., Прозорова Л.А., Богатов В.В., Саенко Е.М. Моллюски. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 6. Ч. 1. СПб.: Наука. 2004. С. 9 – 492.
33. Филимонова Л. В. Обнаружение новых промежуточного и дополнительного хозяев трематоды *Nanophyetus schikhobalowi* // Тр. ГЕЛАН. 1964. Т. 14. С. 246 – 251.
34. Филимонова Л.В. Биологический цикл трематоды *Nanophyetus schikhobalowi* // Тр. ГЕЛАН. 1963. Т. 13. С. 347 – 357.
35. Филимонова Л.В. Распространение нанофиедоза на территории советского Дальнего Востока // Тр. ГЕЛАН. 1966. Т. 17. С. 240 – 244.
36. Хрисанфова Г.Г., Лопаткин А.А., Мищенко В.В., Хейдорова Е.А., Дороженкова Т.Е., Жукова Т.В., Рысков А.П., Семенова С.К. Генетическая изменчивость птичьих шистосом (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) озера Нарочь: идентификация нового вида в группе *Trichobilharzia ocellata* // Доклады Академии Наук. 2009. Т. 428, № 5. С. 698 – 702.
37. Хрисанфова Г.Г., Лопаткин А.А., Шестак А.Г., Мищенко В.А., Жукова Т.В., Акимова Л.Н., Семенова С. К. Полиморфизм гена *cox1* мтДНК церкариальных изолятов птичьей шистосомы *Bilharziella polonica* (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) из водоемов Беларуси // Генетика. 2011. Т. 47, № 5. С. 684 – 690.
38. Челомина Г.Н. Геномика и транскриптомика китайской печеночной двуустки, *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda) // Молекулярная биология. 2017. №2. С. 25 – 36.
39. Шеховцов С.В., Катохин А.В., Конков С., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Федоров К.П., Беспрозванных В.В., Охияма Ф., Сититаворн П., Локтев В.Б., Мордвинов В.А. Исследование генетического разнообразия описторхид – *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. bilis* // «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения». Том 3. Санкт-Петербург: «Лема». 2008. С. 223 – 226.

40. Шеховцов, С. В. Исследование генетического разнообразия эпидемиологически значимых видов описторхид: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск. 2010. – 131 с.
41. Abouheif E., Zardoya R., Meyer A. Limitations of metazoan 18S rRNA sequence data: implications for reconstructing a phylogeny of the animal kingdom and inferring the reality of the Cambrian explosion // *Journal of Molecular Evolution*. 1998. Vol. 47. P. 394 – 405.
42. Ahn I.Y., Winter C.E. The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size, complexity, and structure by DNA reassociation using fluorescent dye // *Genome*. 2006. Vol. 49. P. 1007 – 1015.
43. Aissani B., Bernardi G. CpG islands: features and distribution in genomes of vertebrates // *Gene*. 1991. Vol. 106. P. 173 – 183.
44. Akalesh V., Purobi Nath K., Prasad S.B., Kardong D., Kashyap D., Chillawar R. Homology Modeling and characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) from *Schistosoma japonicum* // *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2013. Vol. 8 P. 82 – 93.
45. Al-Karadaghi S.H., Nikonov M., Jönsson S., Hederstedt B. Lars Crystal structure of ferrochelatase: The terminal enzyme in heme biosynthesis // *Structure*. 1997. Vol. 5. 1501 – 1510.
46. Alvarez L., Evans J.W., Wilks R., Lucas J.N., Brown J.M., Giaccia A.J. Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites // *Genes Chromosomes Cancer*. 1993. Vol. 8. P. 8 – 14.
47. Arbogast B.S., Edwards S.V., Wakely J., Beerli P., Slowinski J.B. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic, population genetic timescales // *Annual Review of Ecology and Systematics*. 2002. Vol. 33. P. 707 – 740.
48. Armache J., Jarascha A., Andreas M., Villab E., Beckera T., Bhushana S., Jossinetc F., Habeckd M., Dindara G., Franckenberga S., Marqueza V., Mielkef T., Thommh M., Berninghausena O., Beatrixa B., Södinga J., Westhofc E., Wilsona D.,

Beckmann R. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5 – Å resolution // PNAS. 2010. Vol. 107, № 46. P. 748 – 753.

49. Atopkin D., Shedko M. Genetic characterization of far eastern species of the genus *Crepidostomum* (Trematoda: Allocreadiidae) by means of 28S ribosomal DNA sequences // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2014. Vol. 5. P. 209 – 215.

50. Atopkin D.M., Beloded A.Y., Ngo H.D., Ha N.V., Tang, N.V. Molecular genetic characterization of the Far Eastern trematode *Skrjabinolecithum spasskii*, Belous, 1954 (Digenea: Haploporidae), a parasite of mullets // Molecular Biology. 2015. Vol. 49. P. 373 – 379.

51. Attwood S.W., Fatih F.A., Upatham E.S. DNA-sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian schistosomiasis // PLOS Neglected Tropical Diseases. 2008. Vol. 2, № 3. P. e200.

52. Avise J.C. Phylogeography. The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press. 2000. 447 p.

53. Bailey S.M., Murnane J.P. Telomeres, chromosome instability and cancer // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 34, № 8. P. 2408 – 2417.

54. Bakhoun A.J., Miquel J., Ndiaye P.I., Justine J., Falchi A., Bâ C.T., Marchand B., Quilichini Y. Advances in Spermatological Characters in the Digenea: Review and Proposal of Spermatozoa Models and Their Phylogenetic Importance // Advances in Parasitology. 2017. Vol. 98. P. 111 – 165.

55. Balloux F., Lehmann L., de Meeûs T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids // Genetics. 2003. Vol. 164, № 4. P. 1635 – 1644.

56. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P., Steitz T. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution // Science. 2000. Vol. 289. P. 905 – 920.

57. 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.

58. Bazsalovicsova E., Kralova-Hromadova I., Spakulova M., Reblanova M., Oberhauserova K. Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants // *Helminthologia*. 2010. Vol. 47. P. 76 – 82.
59. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*. 2000. Vol. 28. P. 235 – 242.
60. Bernhart S.H., Hofacker I.L., Will S., Gruber A.R., Stadler P.F. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments // *BMC Bioinformatics*. 2008. Vol. 9. P. 474 – 511.
61. Bertoni L., Attolini C., Tessera L., Mucciolo E., Giulotto E. Telomeric and non-telomeric (TTAGGG)_n sequences in gene amplification and chromosome stability // *Genomics*. 1994. Vol. 24. P. 53 – 62.
62. Bird A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation // *Nature*. 1986. Vol. 321. P. 209 – 213.
63. Biswal D.K., Chatterjee A., Bhattacharya A., Tandon V. The mitochondrial genome of *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878), the Indian isolate of the lung fluke representative of the family Paragonimidae (Trematoda) // *PeerJ*. 2014. Vol. 2. P. e484.
64. Blair D., Tkach V.V., Barton D.P. Family Troglotretrnatidae Odhner, 1914. In: Bray R.A., Gibson D.I., Jones A. (eds.) *Keys to the Trematoda*. Volume 3. CABI Publishing, Wallingford, UK and the Natural History Museum, London. 2008. P. 277 – 289.
65. Blasco-Costa I., Cutmore S.C., Miller T.L., Nolan M.J. Molecular approaches to trematode systematics: «best practice» and implications for future study // *Systematic Parasitol*. 2016. Vol. 93. P. 295 – 306.
66. Blouin M.S., Yowell C.A., Courtney C.H., Dame J.B. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics // *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15. P. 1719 – 1727.

67. Bohonak A.J. IBD (Isolation By Distance): A program for analyses of isolation by distance // *Journal of Heredity*. 2002. Vol. 93. P. 153 – 154.
68. Bombarova M., Spakulova M., Koubkova B. Telomere analysis of platyhelminthes and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization // *Genome*. 2009. Vol. 52. P. 897 – 903.
69. Bouzid W., Stefka J., Hysp V., Lek S., Scholz T., Legal L., Ben Hassine O.K., Loot G. Geography and host specificity: two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) // *International Journal for Parasitology*. 2008. Vol. 38. P. 1465 – 1479.
70. Bowles J., Blair D., McManus D.P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing // *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992. Vol. 54. P. 165 – 173.
71. Bowles J., Blair D., McManus D.P. Molecular genetic characterization of the cervid strain («northern form») of *Echinococcus granulosus* // *Parasitology*. 1994. Vol. 109. P. 215 – 221.
72. Bowles J., Hope M., Tiu W.U., Liu X., McManus D.P. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum* // *Acta Tropica*. 1993. Vol. 55. P. 217 – 229.
73. Bowman D.D., Hendrix C.M., Lindsay D.S., Stephen C.B. Chapter 2. The Trematodes - Feline Clinical Parasitology. John Wiley & Sons, Ltd. 2008. P. 83 – 182.
74. Brant S.V., Loker E.S. Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *The Journal of Parasitology*. 2009. Vol. 95, № 4. P. 941 – 963.
75. Brimacombe R., Maly P., Zwieb C. The structure of ribosomal RNA and its organization relative to ribosomal protein // *Molecular Biology*. 1983. Vol. 28. P. 1 – 48.
76. Britten R. DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation // *Proceedings Natural Academy Science*. 1996. Vol. 93, № 18. P. 9374 – 9377.

77. Cannone J., Subramanian S., Schnare M., Collett J. The Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // *Bioinformatics*. 2002. Vol. 3. P. 15 – 30.
78. Capriotti E., Marti-Renom M.A. RNA structure alignment by a unit-vector approach // *Bioinformatics*. 2008. Vol. 24. P. 112 – 118.
79. Chai J. Echinostomes in humans. In: Toledo, R., Fried, B. (eds.) *The Biology of Echinostomes*. New York: Springer. 2009. P. 147 – 183.
80. Chandramouli P., Topf M., Menetret J.F, Eswar N., Cannone J.J., Gutell R.R., Sali A., Akey C.W. Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution // *Structure*. 2008. Vol. 16. P. 535 – 548.
81. Chao-Yang L., Shou-Yu G. Comparative analysis of secondary structure of 5.8S-ITS2 rRNA in the genus *Usnea* // *Mycosystema*. 2009. Vol. 28, № 5. P. 705 – 711.
82. Chapin E.A. A new genus and species of trematode, the probable cause of salmon-poisoning in dogs // *Veterinary Clinics of North America*. 1926. Vol. 7. P. 36 – 37.
83. Chapin E.A. Note // *International Journal for Parasitology*. 1928. Vol. 14. P. 60.
84. Chelomina G.N., Rozhkovan K.V., Voronova A.N., Burundukova O.L., Muzarok T.I., Zhuravlev Yu.N. Variation in the number of nucleoli and incomplete homogenization of 18S ribosomal DNA sequences in leaf cells of the cultivated Oriental ginseng (*Panax ginseng* Meyer) // *Journal of Ginseng Research*. 2016. Vol. 40. P. 176 – 184
85. Chelomina G.N., Tatonova Y.V., Hung N.M., Ngo H.D. Genetic diversity of the Chinese liver fluke *Clonorchis sinensis* from Russia and Vietnam // *International Journal for Parasitology*. 2014. Vol. 44. P. 795 – 810.
86. Chen D., Wang G., Yao W., Nie P. Utility of ITS1-5.8S-ITS2 sequences for species discrimination and phylogenetic inference of two closely related bucephalid

digeneans (Digenea: Bucephalidae): *Dollfustrema vaneyi* and *Dollfustrema hefeiensis* // Parasitology Research. 2007. Vol. 101. P. 791 – 800. (a)

87. Chen M.X., Gao Q., Nie P. Phylogenetic systematic inference in the Aspidogastrea (Platyhelminthes, Trematoda) based on the 18S rRNA sequence // Acta Hydrobiologica Sinica. 2007. Vol. 31. P. 821 – 827. (б)

88. Choudhary K., Verma A., Swaroop S. A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region // Helminthologia. 2015. Vol. 52, №3. P. 167 – 187.

89. Choudhury A., Valdez R.R., Johnson R.C., Hoffmann B., Perez-Ponce de Leon G.P.P. The phylogenetic position of Allocreadiidae (Trematoda: Digenea) from partial sequences of the 18S and 28S ribosomal RNA genes // Journal of Parasitology. 2007. Vol. 93. P. 192 – 196.

90. Coleman A. ITS-2 Is a double – edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends in Genetics. 2003. Vol. 19. P. 370 – 375.

91. Coleman A., Jeffrey C., Mai J. Ribosomal DNA ITS1 and ITS2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness // Journal of Molecular Evolution. 1997. Vol. 45. P. 168 – 177.

92. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // Trends in Genetics. 2015. Vol. 31. P. 157 – 163.

93. Coombs I. Helminth species recovered from humans. In: Crompton D.W.T., Savioli L. (eds.) Handbook of Helminthiasis for Public Health. Florida: CRC Press. 2006. P. 12-24.

94. Cooper D.N., Taggart M.H., Bird A.P. Unmethylated domains invertebrate DNA // Nucleic Acids Research. 1983. Vol. 11. P. 647 – 658.

95. Cortadas J., Pavon C. The organization of ribosomal genes in vertebrates // EMBO. 1982. Vol. 1, № 9. P. 1075 – 1080.

96. Crespi B.J., Fulton M.J. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. Vol. 31. P. 658 – 679.

97. Crête-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7. P. e46662.
98. Cribb T.H., Bray R.A., Littlewood, D.T.J. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes // *International Journal for Parasitology*. 2001. Vol. 31. P. 997 – 1011.
99. Criscione C.D., Blouin M.S. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes // *Evolution*. 2004. Vol. 58. P. 198 – 202.
100. Curran S.S., Tkach V.V., Overstreet R.M. Molecular evidence for two cryptic species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae) in freshwater fishes of the southeastern United States // *Comparative Parasitology*. 2013. Vol. 80. P. 186 – 195.
101. Curtis I.A. Vertical distribution of an estuarine snail altered by a parasite // *Science*. 1987. Vol. 235. P. 1509 – 1511.
102. Curtis M., Lively A. Review of Red Queen models for the persistence of obligate sexual reproduction // *Journal of Heredity*. 2010. Vol. 101. P. 13 – 20.
103. Day J.P., Limoli C.L., Morgan W.F. Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells // *Carcinogenesis*. 1998. Vol. 19. P. 259 – 65.
104. De Rijk P., Neefs M., Van de Peer Y., De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences // *Journal of Nucleic Acids Research*. 1992. Vol. 20. P. 2075 – 2089.
105. Demeshkina N., Repkova M., Veniaminova A., Graifer D., Karpova G. Nucleotides of 18S rRNA surrounding mRNA codons at the human ribosomal A, P, and E sites: A crosslinking study with mRNA analogs carrying an aryl azide group at either the uracil or the guanine residue // *RNA*. 2000. Vol. 6. P. 1727 – 1736.
106. Dixon M., Hillis D. Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. Vol. 10. P. 256 – 267.

107. Doanh P.N., Guo Z.H., Nonaka N., Horii Y., Nawa Y. Natural hybridization between *Paragonimus harinasutai* and *Paragonimus bangkokensis* // *Parasitology International*. 2013. Vol. 62, № 3. P. 240 – 245.
108. Doelling J.H., Pikaard C.S. Species-specificity of rRNA cells, gene transcription in plants manifested as a switch in polymerase – specificity // *Nucleic Acids Research*. 1996. Vol. 24. P. 4725 – 4732.
109. Dorado D., Sánchez J. Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Variation in the Gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata* in Belize and Panama // *Smithsonian contributions to the Marine science*. 2009. Vol. 38. P. 174 – 179.
110. Doudna J.A., Rath V.L. Structure and function minireview of the eukaryotic ribosome // *Cell*. 2002. Vol. 109. P.153 – 156.
111. Dover G. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated // *Trends in Genetics*. 1986. Vol. 2. P 159 – 165.
112. Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences // *Molecular biology and evolution*. 2005. Vol. 22. P. 1185 – 1192.
113. Drummond A.J., Suchard M.A., Dong X., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. // *Molecular Biology and Evolution*. 2012. Vol. 29, № 8. P. 1969 – 1973.
114. Edger P.P., Tang M., Bird K.A., Mayfield D.R., Conant G. Secondary Structure Analyses of the Nuclear rRNA Internal Transcribed Spacers and Assessment of Its Phylogenetic Utility across the Brassicaceae (Mustards) // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. P. e101341.
115. Emerson B.C., Hickerson M.J. Lack of support for time-dependent molecular evolution hypothesis // *Molecular Ecology*. 2015. Vol. 34. P. 702 – 709.
116. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis // *Evolutionary Bioinformatics*. 2005. Vol. 1. P. 47 – 50.
117. Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method // *The American Naturalist*. 1985. Vol. 125. P. 1 – 15.

118. Field K.G., Olsen G.J., Lane D.G., Giovannoni S.J., Ghiselin M.T., Raff E.C., Pace N.R., Raff, R.A. Molecular phylogeny of the animal kingdom // *Science*. 1988. Vol. 239. P. 748 – 753.
119. Friedrich M., Tautz D. An episodic change of rDNA nucleotide substitution rate has occurred at the time of the emergence of the insect order Diptera // *Molecular Biology and Evolution*. 1997. Vol. 14. P. 644 – 653. (a)
120. Friedrich M., Tautz D. Evolution and phylogeny of the Diptera: a molecular phylogenetic analysis using 28S rDNA sequences // *Systematic Biology*. 1997. Vol. 46. P. 674 – 698. (б)
121. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics*. 1997. Vol. 147, № 2. P. 915 – 925.
122. Gebhardt G.A. Studies on the molluscan and fish hosts of the «salmon poisoning» fluke, *Nanophyetus salmincola* (Chapin): master's thesis. Corvallis, Oregon State University. 1966. – 64 p.
123. Gerbi S.A. Expansion segments: Regions of variable size that interrupt the universal core secondary structure of ribosomal RNA. In: Zimmermann R.A., Dahlberg A.E. (eds.) *Ribosomal RNA-structure, evolution, processing, and function in protein synthesis*. Boca Raton: CRC Press. 1996. P. 71 – 87.
124. Ghatani S., Shylla J., Tandon V., Chatterjee A., Roy B. Molecular characterization of pouched amphistome parasites (Trematoda: Gastrothylacidae) using ribosomal ITS-2 sequence and secondary structures // *Journal of Helminthology*. 2012. Vol. 86, № 1. P. 117 – 124.
125. Gibbard P., Kolfshoten T.V. The Pleistocene and Holocene Epochs. In: Gradstein F.M., Ogg J.G., Smith A.G. (eds.) *A Geologic Time Scale 2004*. Cambridge: Cambridge University Press. 2004. P. 441 – 452.
126. Gillespie J., Johnston J., Cannone J., Gutell R. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements // *Insect Molecular Biology*. 2006. Vol. 5. P. 657 – 686.

127. Giudicelli G.C., Mäder G., Silva-Arias G.A., Zamberlan P.M., Bonatto S.L., Freitas L.B. Secondary structure of nrDNA Internal Transcribed Spacers as a useful tool to align highly divergent species in phylogenetic studies // *Genetics and Molecular Biology*. 2017. Vol. 40. P. 191 – 199.
128. Gladyshev E.A., Arkhipova I.R. Telomere-associated endonuclease-deficient penelopelike retroelements in diverse eukaryotes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104. P. 9352 – 9357.
129. Griffiths R.C., Tavaré S. Ancestral inference in population genetics // *Statistical Science*. 1994. Vol. 9. P. 307 – 319.
130. Gruendler P., Unfried I., Pascher K., Schweizer D. rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana* structural analysis, infraspecific variation and functional implications // *Journal of Molecular Biology*. 1991. Vol. 221. P. 1209 – 1222.
131. Gunnar A., Odd N. A possible tertiary rRNA interaction between expansion segments ES3 and ES6 in eukaryotic 40S ribosomal subunits // *RNA*. 2003. Vol. 9. P. 20 – 24.
132. Gutell R., Noller H., Woese C. Higher order structure in ribosomal RNA // *EMBO*. 1986. Vol. 5. P. 1111 – 1113.
133. Gutell R., Weiser B., Woese C.R., Noller H.F. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA // *Nucleic Acids Research*. 1985. Vol. 32. P. 155 – 216.
134. Gutell R.R. Comparative sequence analysis and the structure of 16S and 23S rRNA // *CRC Press*. 1993. Vol. 5. P. 111 – 128.
135. Gutell R.R., Fox G.E. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format // *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1988. Vol. 16. P. 175 – 269.
136. Gutell R.R., Schnare M.N., Gray M. A compilation of large subunit, 23S and 23S-like ribosomal RNA structures // *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1992. Vol. 20. P. 2095 – 2109.
137. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41. P. 95 – 98.

138. Hamburger J., Turetski Irit T., Kapeller I., Deresiewicz R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe // *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991. Vol. 44. P. 73 – 80.
139. Hammerschmidt K., Koch K., Milinski M., Chubb J.C., Parker G.A. When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles // *Evolution*. 2009. Vol. 63. P. 1976 – 1986.
140. Hancock J. The contribution of DNA slippage to eukaryotic nuclear 18S rRNA evolution // *Journal of Molecular Evolution*. 1995. Vol. 40. P. 629 – 639.
141. Harrel L.W., Deardorf T.L. Human nanophyetiasis: Transmission by handling naturally infected coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) // *International Journal of Infectious Diseases*. 1990. Vol. 161. P. 146 – 148.
142. Harris D., Crandall A. Intragenomic variation within ITS-1 and ITS-2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies // *Molecular Biology and Evolution*. 2000. Vol. 17, № 2. P. 284 – 291.
143. Harvell C.D., Mitchel C.E., Ward J.R., Altizer S., Dobson A.P., Ostfeld R.S., Samuel M.D. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota // *Science*. 2002. Vol. 296. P. 2158 – 2162.
144. Headley S.A., Scorpio D.G., Vidotto O., Dumler J.S. *Neorickettsia helminthoeca* and salmon poisoning disease: a review // *Veterinary Journal*. 2011. Vol. 187. P. 165 – 173.
145. Herrmann K.K., Poulin R., Keeney D.B., Blasco-Costa I. Genetic structure in a progenetic trematode: signs of cryptic species with contrasting reproductive strategies // *The International Journal for Parasitology*. 2014. Vol. 44. P. 811 – 818.
146. Hewitt G.M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 2004. Vol. 359. P. 183 – 195.

147. Hirai H., LoVerde P.T. Identification of the telomeres on *Schistosoma mansoni* chromosomes by FISH // *The Journal of Parasitology*. 1996. Vol. 82. P. 511 – 522.
148. Hofacker I. Vienna RNA secondary structure server // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31. P. 3429 – 3431.
149. Hofacker I.L., Fekete M., Stadler P.F. Secondary structure prediction for aligned RNA sequences // *Journal of Molecular Biology*. 2002. Vol. 319, №. 5. P. 1059 – 1066.
150. Hoogsteen K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine // *Acta Crystallographica*. 1963. Vol. 16. P. 907 – 916.
151. Hribova E., Cizkova J., Christelova P., Taudien S., Langhe E., Dolezel J. The ITS1-5.8S-ITS2 sequence region in the Musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 3. P. e17863.
152. 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.
153. Hunter R. Structure and evolution of the rDNA internal transcribed spacer its region 2 in the symbiotic dinoflagellates *Symbiodinium dinophyta* // *Journal of Phycology*. 2007. Vol. 43. P. 120 – 128.
154. Huyse T., Poulin R., Théron A. Speciation in parasites: A population genetics approach // *Trends in Parasitology*. 2005. Vol. 21. P. 469 – 475.
155. Hwang U., Kim W. General properties, phylogenetic utilities of nuclear ribosomal, and mt DNA commonly used in molecular systematics // *The Korean Journal of Parasitology*. 1999. Vol. 37, №4. P. 215 – 228.
156. Ichikawa M., Bawn S., Maw N.N., Htun L.L., Thein M., Gyi A., Sunn K., Katakura K., Itagaki T. Characterization of *Fasciola* spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis status and nuclear and mitochondrial DNA markers // *Parasitology International*. 2011. Vol. 60, №4. P. 474 – 479.

157. Iwagami M., Ho L.Y., Su K., Lai P.F., Fukushima M., Nakano M., Blair D., Kawashima K., Agatsuma T. Molecular phylogeographic studies on *Paragonimus westermani* in Asia // Journal of Helminthology. 2000. Vol. 74. P. 315 – 322.
158. Joffe B.I., Solovei I.V., Macgregor H.C. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes) // Chromosoma. 1998. Vol. 107. P. 173 – 183.
159. John D.T., Petri W.A. Jr. Markell and Voge's Medical Parasitology. St. Louis. Elsevier Inc. 2006. 480 p.
160. Johnson K.P., Williams B.L., Drown D.M., Adams R.J., Clayton D.H. The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phthiraptera) // Molecular Ecology. 2002. Vol. 11. P. 25 – 38.
161. Jousson O., Bartoli P., Zaninetti L., Pawlowski, J. Use of the ITS rDNA for elucidation of some life – cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea) // International Journal for Parasitology. 1998. Vol. 28. P. 1403 – 1411.
162. Kasl E.L., Fayton T.J., Font W.F., Criscione C.D. *Alloglossidium floridense* n. sp. (Digenea: Macroderoididae) from a spring run in North Central Florida // International Journal for Parasitology. 2014. Vol. 100. P. 121 – 126.
163. Kelley L.A, Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // Nature Protocols. 2015. Vol. 10. P. 845 – 858.
164. Ki J.S. Hypervariable regions (V1 – V9) of the dinoflagellate 18S rRNA using a large dataset for marker considerations // Journal of Applied Phycology. 2012. Vol. 24. P. 1035 – 1043.
165. Kilburn A.E., Shea M.J., Sargent R.G., Wilson J.H. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability // Molecular Cell Biology. 2001. Vol. 21. P. 126 – 35.
166. Kim Y-J., Yoo W.G., Lee M-R., Kang J-M., Na B-K., Cho S-H., Park M-Y., Ju J-W. Molecular and Structural Characterization of the Tegumental 20.6-kDa Protein in *Clonorchis sinensis* as a Potential Druggable Target // International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 557. P. 1 – 18.

167. 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. P. 111 – 120.
168. Kinne O. Diseases of marine animals. Vol. IV. Pisces, applied aspects, conclusions. John Wiley & Sons, Ltd. 1980. 461 p.
169. Kistner T.P., Wyse D., Schmitz J.A. Pathogenicity attributed to massive infection of *Nanophyeteus salmincola* in a cougar // *Journal of Wildlife*. 1979. Vol. 14. P. 419 – 622.
170. Kjer K.M. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs // *Molecular Phylogenetic Evolution*. 1995. Vol. 4. P. 314 – 330.
171. Koetschan C., Forster F., Keller A., Schleicher T., Ruderisch B., Schwarz R., Muller T., Wolf M., Schultz J. The ITS-2 database III-sequences and structures for phylogeny // *Nucleic Acids Research*. 2010. Vol. 38. P. 275 – 279.
172. Köhsler M., Leitner B., Blaschitz M., Michel R., Aspöck H., Walochnik J. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequences type in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa) // *Parasitology Research*. 2006. Vol. 98. P. 86 – 93.
173. Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A., Birstein V.J., Ludwig A. Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the Acipenseridae // *The Journal of Heredity*. 2006. Vol. 97. P. 218 – 225.
174. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33, № 7. P.1870 – 1874.
175. Kuris A.M., Hechinger R.F., Shaw J.C., Whitney K.L., Aguirre-Macedo L., Boch C.A., Dobson A.P., Dunham E.J., Fredensborg B.L., Huspeni T.C. Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries // *Nature*. 2008. Vol. 454. P. 515 – 518.

176. Lakshmikumaran M., Negi M.S. Structural analysis of two length variants of the rDNA intergenic spacer from *Eruca sativa* // Plant Molecular Biology. 1994. Vol. 24. P. 915 – 927.
177. Lapierre A.R. Molecular Phylogeny of the Trematode Families Diplostomidae and Strigeidae: master's thesis. Canada, Concordia University. 2011. – 116 p.
178. Larson A., Wilson, A.C. Patterns of ribosomal RNA evolution in salamanders // Molecular Biology and Evolution. 1989. Vol. 6. P. 1 – 154.
179. Latchman D.S. Eukaryotic Transcription Factors // Academic Press, San Diego. 1995. P. 292 – 308.
180. Lawton S., Bowen L., Emery A., Majoros G. Signatures of mito-nuclear discordance in *Schistosoma turkestanicum* indicate a complex evolutionary history of emergence in Europe // Parasitology. 2017. Vol. 144. P. 1752 – 1762.
181. Le T.H., Pearson M.S., Blair D., Dai N., Zhang L.H., McManus D.P. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus* // Parasitology. 2002. Vol. 124. P. 97 – 111.
182. Lee D., Choe S., Park H. Complete Mitochondrial Genome of *Haplorchis taichui* and Comparative Analysis with Other Trematodes // The Korean Journal of Parasitology. 2013. Vol. 51. P. 719 – 726.
183. Lee J., Gutell R. Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs // Journal of Molecular Biology. 2004. Vol. 344. P.1225 – 1249.
184. Lee S., Huh S. Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of *Clonorchis sinensis* // The Korean Journal of Parasitology. 2004. Vol. 42. P. 145 – 148.
185. Lefebvre T., Lebarbenchon C., Gauthier-Clerc M., Misse D., Poulin R., Thomas F. The ecological significance of manipulative parasites // Trends in Ecology & Evolution. 2009. Vol. 24. P. 41 – 48.

186. Lemey P., Rambaut A., Drummond A.J., Suchard M.A. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*. 2009. Vol. 5. e1000520.
187. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25. P. 1451 – 1452.
188. Lin K.W., Yan J. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences // *Mutation Research*. 2008. Vol. 658. P. 95 – 110.
189. Lindsay S., Bird A.P. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA // *Nature*. 1987. Vol. 327. P. 336 – 338.
190. Littlewood D.T. J., Olson P.D., 2001. Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: Littlewood D.T.J., Bray R.A. (eds.) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor and Francis. P. 262 – 278.
191. Littlewood D.T., Rohde K.A., Clough K.A. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules // *The Biological Journal of the Linnean Society*. 1999. Vol. 114. P. 66 – 75.
192. Lively C.M., Dybdahl M.F. Parasite adaptation to locally common host genotypes // *Nature*. 2000. Vol. 405. P. 679 – 681.
193. Lockyer A.E., Olson P.D., Littlewood D.T.J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003. Vol. 78. P. 155 – 171.
194. Lockyer A.E., Olson P.D., Littlewood D.T.J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003. Vol. 78. P. 155 – 171.
195. Long E., Dawi I. Repeated genes in eukaryotes // *Annual Review of Biochemistry*. 1980. Vol. 49. P. 727 – 764.

196. Lorenz C. Lünse C.E., Mörl M. tRNA Modifications: Impact on structure and thermal adaptation // *Biomolecules*. 2017. Vol. 7. P. 35.
197. Lotfy W.M., Brant S.V., DeJong R.J., Le T.H., Demiaszkiewicz A., Rajapakse R. P. V. J., Mareka M., Zouhara M., Doudab O., Mazakova J., Rysanek P. Bioinformatics-assisted characterization of the ITS1-5,8S-ITS2 segments of nuclear rRNA gene clusters, and its exploitation in molecular diagnostics of European crop-parasitic nematodes of the genus *Ditylenchus* // *Plant Pathology*. 2010. Vol. 59. P. 931 – 943.
198. Luton K., Walker D., Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) // *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992. Vol. 56. P. 323 – 328.
199. Ma J., He J.J., Liu G.H., Leontovyč R., Kašný M., Zhu X.Q. Complete mitochondrial genome of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Digenea: Fasciolidae) and its comparison with selected trematodes // *Parasites & Vectors*. 2016. Vol. 9. P. 429.
200. Mai J.C., Coleman A.W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants // *Journal of Molecular Biology*. 1997. Vol. 44. P. 258 – 271.
201. Mallatt J., Craig C.W., Yoder M.J. Nearly complete rRNA genes assembled from across the metazoan animals: effects of more taxa, a structure-based alignment, and paired-sites evolutionary models on phylogeny reconstruction // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. Vol. 55. P. 1 – 17.
202. Matejusova I., Cunningham C.O. The first complete monogenean ribosomal RNA gene operon: sequence and secondary structure of the *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957, large subunit ribosomal RNA gene // *Journal of Parasitology*. 2004. Vol. 90. P. 146 – 151.
203. Mathews D.H. Revolutions in RNA secondary structure prediction // *Journal of Molecular Biology*. 2006. Vol. 359, № 3. P. 526 – 532.

204. Maule A.G., Marks N., London J. Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology // UK: CAB International. 2006. Vol. 123. P. 37 – 80.
205. McCoy K.D., Boulinier T., Tirard C., Michalakis Y. Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae* // Journal of Evolutionary Biology. 2001. Vol. 14. P. 395 – 405.
206. McGinnis J.L., Duncan C.D., Weeks K.M. High-throughput SHAPE and hydroxyl radical analysis of RNA structure and ribonucleoprotein assembly // Methods in Enzymology. 2009. Vol. 468. P. 67 – 89.
207. McManus D.P., Bowles J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in applied parasitology and systematics // International Journal for Parasitology. 1996. Vol. 26. P. 687 – 704.
208. Mears J.A., Cannone S.M., Stagg R.R., Gutell R.K., Agrawal S.C. Harvey Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis // Journal of Molecular Biology. 2002. Vol. 321. P. 215 – 234.
209. Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes // Chromosoma. 1990. Vol. 99. P. 3 – 10.
210. Michot B., Despres L., Bonhomme F., Bachellerie J.P. Conserved secondary structures in the ITS2 of trematode pre-rRNA // FEBS Letters. 1993. Vol. 316. P. 247 – 252.
211. Millemann R. E., Knapp S. E. Biology of *Nanophyetus salmincola* and «salmon poisoning» disease // Advances in Parasitology. 1970. Vol. 8. P. 1 – 41.
212. Miura O., Kuris A.M., Torchin M.E., Hechinger R.F., Dunham E.J., Chiba S. Introduced cryptic species of parasites exhibit different invasion pathways // International Journal for Parasitology. 2005. Vol. 35. P. 793 – 801.
213. Moazed D., Noller H.F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA // Nature. 1987. Vol. 327. P. 389 – 394.

214. Morgan J.A., Blair D. Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify echinostome isolates from Australia and New Zealand // *International Journal of Parasitology*. 1998. Vol. 28, № 3. P. 493 – 502. (a)
215. Morgan J.A., Blair D. Trematode and monogenean rRNA ITS2 secondary structures support a four-domain model // *Journal of Molecular Evolution*. 1998. Vol. 47. P. 406 – 419. (б)
216. Morgan J.A., Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collarspine group // *Parasitology*. 1995. Vol. 111. P. 609 – 615.
217. Muñoz G., López Z., Cárdenas L. Morphological and molecular analyses of larval trematodes in the intertidal bivalve *Perumytilus purpuratus* of Central Chile // *Journal of Helminthology*. 2013. Vol. 87. P. 356 – 363.
218. Na L., Gao J.F., Liu, G.H., Fu X., Su X., Yue D.M., Gao Y., Zhang Y., Wang C.R. The complete mitochondrial genome of *Metorchis orientalis* (Trematoda: Opisthorchiidae): Comparison with other closely related species and phylogenetic implications // *Infection, Genetics and Evolution*. 2016. Vol. 39. P. 45 – 50.
219. Nadler S.A., Pérez-Ponce de León G. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology // *Parasitology*. 2011. Vol. 138. P 1688 – 1709.
220. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. USA: Columbia University Press. 1987. 512 p.
221. Nei M., Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions // *Molecular biology and evolution*. 1986. Vol. 3, № 5. P. 418 – 426.
222. Nieberding C., Morand S., Libois R., Michaux J.R. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host // *Proceedings of the Royal Society*. 2004. Vol. 271. P. 2559 – 2568.
223. Nikolova E.N., Kim E., Wise A.A., O'Brien P.J., Andricioaei I., Al-Hashimi H.M. Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA // *Nature*. 2011. Vol. 470. P. 498 – 502.

224. Nolan M.J., Cribb T.H. The Use and Implications of Ribosomal DNA Sequencing for the Discrimination of Digenean Species // *Advantages in Parasitology*. 2005. Vol. 60. P. 101 – 157.
225. Noller H.F. RNA structure: reading the ribosome // *Science*. 2005. Vol. 309. P. 1508 – 1514.
226. Noller H.F., Woese C.R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA // *Science*. 1981. Vol. 212. P. 403 – 411.
227. Olson P. D., Littlewood D. T, Rodney A. B., Jean M. Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) // *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 2001. Vol. 19, №. 3. P. 443 – 467.
228. Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T.J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) // *International Journal for Parasitology*. 2003. Vol. 33. P. 733 – 755.
229. Osorio C.R., Collins M.D., Romalde J.L., Toranzo A.E. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71. P. 636 – 645.
230. Painter J.N., Slitonen J., Hanski I. Phylogeographic patterns and genetic diversity in three species of Eurasian boreal forest beetles // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2007. Vol. 91. P. 267 – 279.
231. Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Katokhin A.V., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: Identification and characterization // *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2012. Vol. 181. P. 190 – 194.
232. Park G.M. Genetic comparison of liver flukes, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, based on rDNA and mtDNA gene sequences // *Parasitology Research*. 2007. Vol. 100. P. 351 – 357.
233. Park G.M., Im K., Yong T. S. Phylogenetic relationship of ribosomal ITS2 and mitochondrial CO1 among diploid and triploid *Paragonimus westermani* isolates // *The Korean Journal of Parasitology*. 2003. Vol. 41. P. 47 – 55.

234. Petrov A.S., Bernier C.R., Gulen B., Waterbury C.C., Hershkovits E., Hsiao C., Harvey S.C., Hud N.V, Fox G.E., Wartell R.M., Williams L.D. Secondary structures of rRNAs from all three domains of life // PLoS One. 2014. Vol. 9. P. e88222.
235. Philippe H., Laurent J. How good are deep phylogenetic trees? // Current Opinion in Genetics & Development. 1998. Vol. 8. P.616 – 623.
236. Picard D., Jousson O. Genetic variability among cercariae of the Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) causing swimmer's itch in Europe. // Parasite. 2001. Vol. 8. P. 237 – 242.
237. Pinto H.A., Griffin M.J., Quiniou S.M. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study // Parasitology Research. 2016. Vol. 115. P. 51 – 62.
238. Poinar G.O., Boucot A.J. Evidence of intestinal parasites of dinosaurs // Parasitology. 2006. Vol. 133. P. 245 – 249.
239. Ponton F., Lefèvre T., Lebarbenchon C., Thomas F., Loxdale H.D., Marché L., Renault L., Perrot-Minnot M.J., Biron D.G. Do distantly related parasites rely on the same proximate factors to alter the behaviour of their hosts? // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. Vol. 273. P. 2869 – 2877.
240. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. Vol. 14, № 9. P. 817 – 818.
241. Prasad P., Veena K., Devendra T., Kumar B., Lalit M., Goswami A. Use of sequence motifs as barcodes and secondary structures of Internal Transcribed spacer 2 (ITS-2, rDNA) for identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) // Bioinformation. 2009. Vol. 3, № 7. P. 314 – 320.
242. Prasad P.K., Tandon V., Chatterjee A., Bandyopadhyay S. PCR-based determination of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA of giant intestinal fluke, *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899 // Parasitology Research. 2007. Vol. 101. P. 1581 – 1587.

243. Qi Liu, Kurt F. Intersubunit bridges of the bacterial ribosome // *Journal of Molecular Biology*. 2016. Vol. 428. P. 2146 – 2164.
244. Rambaut A. FigTree v1.3.1. 2014. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
245. Rambaut A., Suchard M.A., Xie D., Drummond A.J. Tracer v1.6. 2013. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
246. Rampersad S.N. ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* species complex // *Springer Plus*. 2014. Vol. 3. P. 684.
247. Razo-Mendivil U., Vazquez-Dominguez E., Rosas-Valdez R., de Leon G. P.P., Nadler S.A. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial DNA reveals a complex of cryptic species in *Crassicutis cichlasomae* (Digenea: Apocreadiidae), a parasite of Middle-American cichlids // *International Journal for Parasitology*. 2010. Vol. 40. P. 471 – 486.
248. Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // *BMC Bioinformatics*. 2010. Vol. 11. P. 129.
249. Rhodes D., Klug A. Zinc fingers // *Scientific American*. 1993. Vol. 268, №2. P. 56 – 65.
250. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Molecular Biology and Evolution*. 1992. Vol. 9, № 3. P. 552 – 569.
251. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *BMC Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P.1572 – 1574.
252. Rungger D., Achermann H., Crippa M. Transcription of spacer sequences in genes coding for ribosomal RNA in *Xenopus* cells // *Proceedings Natural Academy of Science*. 1979. Vol. 76, № 8. P. 3957 – 3961.
253. Saito Y., Saito S., Yamashita T., Watanabe T., Sekikawa T. On *Nanophyetus japonensis* n. sp. from northern district, Honshu, Japan (Trematoda: Nanophyetidae) // *Acta Medica et Biologica*. 1982. Vol. 30. P. 1 – 15.
254. Sakka H., Pierre Quéré J., Kartavtseva I., Pavlenko M., Chelomina G., Atopkin D., Bogdanov A., Michaux J. Comparative phylogeography of four

Apodemus species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2010. Vol. 100. P. 797 – 821.

255. Sanabria R., Gaston M., Romero J. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae) // *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 177. P. 182 – 185.

256. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig D., Pesber W. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2001. Vol. 47. P. 349 – 358.

257. Schubert M., Labudde D., Oschkinat H., Schmieder P. A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on C-13 chemical shift statistics // *Journal of Biomolecular NMR*. 2002. Vol. 24. P. 149 – 154.

258. Schultz J., Maisel S., Gerlach D., Müller T., Wolf M. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // *RNA*. 2005. Vol. 11. P. 361 – 364.

259. Schultz J., Muller T., Actziger M., Seibel P.N., Dandekar T., Wolf M. The internal transcribed spacer 2 Database – a web server for (not only) low level phylogenetic analyses // *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34. P. 704 – 707.

260. Schwalie C. Petra Genome – wide analyses of transcriptional regulation across multiple tissues and species: A dissertation submitted to the University of Cambridge for the degree of Doctor of Philosophy. Newnham. 2012. – 208 p.

261. Selig C., Wolf M., Muller T., Dandekar T., Schultz J. The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics // *Nucleic Acids Research*. 2008. Vol. 36. P. 377 – 380.

262. Semyenova S.K., Morozova E.V., Chrisanfova G.G. Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian populations of the liver fluke *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox* genes // *International Journal for Parasitology*. 2006. Vol. 92. P. 525 – 530.

263. Semyenova S.K., Morozova E.V., Chrisanfova G.G., Gorokhov V.V., Arkhipov I.A., Moskvina A.S., Movsessyan S.O., Ryskov A.P. Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* // International Journal for Parasitology. 2006. Vol. 92. P. 525 – 530.
264. Serganov A., Nudler E.A. decade of riboswitches // Cell. 2013. Vol. 152. P. 17 – 24.
265. Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) // Parasitology International. 2010. Vol. 59. P. 100 – 103.
266. Shen L.X., Cai Z., Tinoco I. RNA structure at high resolution // FASEB J. 1995. Vol. 9. P. 1023 – 1033.
267. Skrjabin K.J., Podjapolskaja W.P. *Nanophyetus schikhobalowi* n. sp., ein neuer Trematode aus dem Darm des Menschen // Cbl Bakt Orig. 1931. Vol. 119. P. 294 – 297.
268. Slatkin M., Hudson R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations // Genetics. 1991. Vol. 129. P. 555 – 562.
269. Slijepcevic P., Xiao Y., Dominguez I., Natarajan A.T. Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites // Chromosoma. 1996. Vol. 104. P. 596 – 604.
270. Snyder S.D., Tkach V.V. *Aptorchis kuchlingi* n. sp. (Digenea: Plagiorchioidea) from the oblong turtle *Chelodina oblonga* (Pleurodira: Chelidae), in western Australia // Comparative Parasitology. 2011. Vol. 78. P. 280 – 285.
271. Sollner B. Tower Transcription of Cloned Eukaryotic Ribosomal RNA // Genes Annual Review of Biochemistry. 1986. Vol. 55. P. 801 – 830.
272. Solodovnik D.A., Tatonova Y.V., Burkovskaya P.V. The geographical vector in distribution of genetic diversity for *Clonorchis sinensis* // Parasitology Research. 2018. Vol. 117. P. 335 – 338.

273. Sorensen E., Drew A.C., Brindley P.J., Bogh H.O., Gasser R.B., Qian B.Z., Chiping Q., McManus D.P. Variation in the sequence of a mitochondrial NADH dehydrogenase I gene fragment among six natural populations of *Schistosoma japonicum* from China // International Journal for Parasitology. 1998. Vol. 28. P. 1931 – 1934.
274. Sorensen R.E., Minchella D.J. Snail - trematode life history interactions: past trends and future directions // Parasitology. 2001. Vol. 123. P. 3 – 18.
275. Stothard J.R., Rollinson D. An evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for the identification and phylogeny of freshwater snails of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae) // The Journal of Molluscan Studies. 1996. Vol. 62. P. 165 – 176.
276. Strong E.E., Colgan D.J., Healy J.M., Lydeard C., Ponder W.F., Glaubrecht M. Phylogeny of the gastropod superfamily Cerithioidea using morphology and molecules // Zoological Journal of the Linnean Society. 2011. Vol. 162. P. 43 – 89.
277. Sun J., Huang Y., Huang H., Liang P., Wang X., Mao Q., Men J., Chen W., Deng C., Zhou C., Lv X., Zhou J., Zhang F., Li R., Tian Y., Lei H., Liang C., Hu X., Xu J., Li X., Yu X. Low divergence of *Clonorchis sinensis* in China based on multilocus analysis // PLoS One. 2013. P. e67006.
278. Sures B. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution // Trends in Parasitology. 2004. Vol. 20. P. 170 – 177.
279. Swargiary A., Akalesh V. Investigation on the binding affinities of different anthelmintic drugs on the 3D model protein structure of acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*: An *in silico* Approach // British Biomedical Bulletin. 2015. Vol. 3. P. 20 – 33.
280. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J. L., Mullineux S. T., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L., Lafontaine D. L. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre- rRNA processing factors // Molecular Cell. 2013. Vol. 51, № 4. P. 539 – 551.
281. Tajima F. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations // Genetics. 1983. Vol. 105. P. 437 – 467.

282. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. Vol. 123, № 3. P. 585 – 595.
283. Tantrawatpan C., Saijuntha W., Paiboon S., Andrews R.H., Petney N. Genetic differentiation of *Artyfechinostomum malayanum* and *A. sufrartyfex* (Trematoda: Echinostomatidae) based on internal transcribed spacer sequences // *Parasitology Research*. 2013. Vol. 112. P. 437 – 441.
284. Tatonova Y.V., Chelomina, G.N., Besprosvannykh V.V. Genetic diversity of *Clonorchis sinensis* (Trematoda: Opisthorchiidae) in the Russian southern Far East based on mtDNA *cox1* sequence variation // *Folia Parasitologica*. 2013. Vol. 60. P. 155 – 162.
285. Tatonova Y.V., Chelomina, G.N., Besprosvannykh, V.V. Genetic diversity of nuclear ITS1-5,8-ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchiidae) from the Russian Far East // *Parasitology International*. 2012. Vol. 61. P. 664 – 674.
286. Taylor D.J., Devkota B., Andrew D., Huang M., Eswar N., Sali A., Harvey C., Joachim F. Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome // *Cell Press*. 2009. Vol. 17. P. 1591 – 1604.
287. Thaenkham U., Blair D., Nawa Y., Waikagul J. Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: are they distinct? // *Parasitology International*. 2012. Vol. 61, №1. P. 90 – 93.
288. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22. P. 4673 – 4680.
289. Tkach V., Grabda-Kazubska B., Pawlowski J., Swiderski Z. Molecular and morphological evidences for close phylogenetic affinities of the genera *Macrodera*, *Leptophallus*, *Metaleptophallus* and *Paralepoderma* (Digenea, Plagiorchioidea) // *Acta Parasitologica*. 1999. Vol. 44. P. 170 – 179.

290. Tkach V., Pawlowski J., Mariaux J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences // International Journal for Parasitology. 2000. Vol. 30. P. 83 – 93.
291. Tkach V.V., Snyder S.D. *Aptorchis glandularis* n. sp. (Digenea: Plagiorchioidea) from the northwestern red-faced turtle, *Emydura australis*, (Pleurodira: Chelidae) in the Kimberley, Western Australia // Journal of Parasitology. 2008. Vol. 94. P. 918 – 924.
292. Tkach V.V., Snyder S.D. *Aptorchis megacetabulus* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) from the northern long-necked turtle *Chelodina rugosa* (Pleurodira: Chelidae) // Journal of Parasitology. 2007. Vol. 93. P. 404 – 408.
293. Tompkins E., Adger W.N., Boyd E., Nicholson-Cole S., Weatherhead K., Arnell M. Observed adaptation to climate change: UK evidence of transition to a well-adapting society // Global Environmental Change. 2010. Vol. 20. № 4. P. 627 – 635.
294. Traut W., Szczepanowski M., Vitkova M., Opitz C., Marec F., Zrzavy. The telomere repeat motif of basal Metazoa // Chromosome Research. 2007. Vol. 15. P. 371 – 382.
295. Trendelenburg M.F., Spring H., Scheer U., Franke W.W. Morphology of nucleolar cistrons in a plant cell *Acetabularia mediterranea* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1974. Vol. 71, № 9. P. 3626 – 3630.
296. Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., Warman M.L. Preparation of PCR – quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) // Bio Techniques. 2000. Vol. 29. P. 52 – 54.
297. Van Herwerden L., Caley M.J., Blair D. Regulatory motifs are present in the ITS1 of some flatworm species // Journal of Experimental Zoology Part B, Molecular and Developmental Evolution. 2003. Vol. 296. P. 80 – 86.
298. Van Herwerden L., Blair D., Agatsuma T. Genetic diversity in parthenogenetic triploid *Paragonimus westermani* // International Journal for Parasitology. 1999. Vol. 29. P. 1477 – 1482.

299. Van Nues R.W., Rientjes J.M.J., Morré S.A., Mollee E., Planta R.J., Venema J., Raué H.A. Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA // *Journal of Molecular Biology*. 1995. Vol. 250. 24 – 36.
300. Van Valen L. A new evolutionary law // *Evolutionary Theory*. 1973. Vol. 1. P. 1 – 30.
301. Vaughan J.A., Tkach V.V., Greiman S.E. Neorickettsial endosymbionts of the Digenea: diversity, transmission and distribution // *Advances in Parasitology*. 2012. Vol. 79. P. 253 – 297.
302. Velichutina I.V., Dresios J., Hong J.Y., Li C., Mankin A., Synetos D., Liebman S.W. Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome // *RNA*. 2000. Vol. 6. P. 1174 – 1184.
303. Vilas R., Criscione C.D., Blouin M.S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites // *Parasitology*. 2005. Vol. 131. P. 839 – 846.
304. Vitkova M., Kral J., Traut W. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n // *Chromosome Research*. 2005. Vol. 13. P. 145 – 156.
305. Voronova A.N., Chelomina G.N. Genetic diversity and phylogenetic relations of salmon trematode *Nanophyetus japonensis* // *Parasitology International*. 2018. Vol. 67. P. 267 – 276.
306. Voronova A.N., Chelomina G.N., Besprozvannykh V.V. and Tkach V. V. Genetic divergence of human pathogens *Nanophyetus* spp. (Trematoda: Troglotrematidae) on the opposite sides of the Pacific Rim // *Parasitology*. 2017. Vol. 144. P. 601 – 612.
307. Voss N.R., Gerstein M., Steitz T.A., Moore P.B. The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *Journal of Molecular Biology*. 2006. Vol. 360. P. 893 – 906.
308. Waikagul J., Thaenkham U. Chapter 5 - Molecular Systematics of Fish-Borne Trematodes. In: Waikagul J., Thaenkham U. (eds.) *Approaches to research on*

the systematics of fish-borne trematodes. Academic Press. Amsterdam. 2014. P. 61 – 76

309. Wang T.P., Shrivastava J., Johansen M.V., Zhang S.Q., Wang F.F., Webster J.P. Does multiple hosts mean multiple parasites? Population genetic structure of *Schistosoma japonicum* between definitive host species // International Journal for Parasitology. 2006. Vol. 36. P. 1317 – 1325.

310. Wass M.N., Kelley L.A., Sternberg M.J. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures // Nucleic Acids Research. 2010. Vol. 38. P. 469 – 473.

311. Wickstrom L.M., Haukisalmi V., Varis S., Hantula J., Fedorov V. B., Henttonen H. Phylogeography of the circumpolar *Paranoplocephala arctica* species complex (Cestoda: Anoplocephalidae) parasitizing collared lemmings (*Dicrostonyx* spp.) // Molecular ecology. 2003. Vol. 12. P. 3359 – 3371.

312. Wilson D.N., Doudna J.H. The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012. Vol. 4. P. a011536.

313. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M., Morgan J. Structure of the 30S ribosomal subunit // Nature. 2000. Vol. 407. P. 327 – 339.

314. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M. L. Towards a natural system of organisms: Archaea, Bacteria, Eucarya // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990. Vol. 87. P. 4576 – 4579.

315. Woese C.R., Magrum L.J., Gupta R., Siegel R.B., Stahl D.A., Kop J., Crawford N., Brosius J., Gutell R.R., Hogan J.J., Noller H.F. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence // Nucleic Acids Research. 1980. Vol. 8. P. 2275 – 2293.

316. Wood C.L., Johnson P.T.J. A world without parasites: exploring the hidden ecology of infection // Frontiers in Ecology and the Environment. 2015. Vol. 13. P. 425 – 434.

317. Yu S., Wang Y., Redei D., Qiang X.Q., Wenjun B.W. Secondary structure models of 18S and 28S rRNAs of the true bugs based on complete rDNA sequences

of *Eurydema maracandica* Oshanin, 1871 (Heteroptera, Pentatomidae) // ZooKeys. 2013. Vol. 319. P. 363 – 377.

318. Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H., Noller H.F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution // Science. 2001. Vol. 292. P. 883 – 896.

319. Zarlenga D.S., George M. *Taenia crassiceps*: cloning and mapping of mitochondrial DNA and its application to the phonetic analysis of a new species of *Taenia* from Southeast Asia // Experimental Parasitology. 1995. Vol. 81. P. 604 – 607.

320. Zarowiecki M.Z., Huyse T., Littlewood D.T.J. Making the most of mitochondrial genomes- markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea) // International Journal of Parasitology. 2007. Vol. 37, №12. P.1401 – 1418.

321. Zhang Q., Yi Z., Song W., Al-Rasheid K.A., Warren A. The systematic position of *Paraspathidium* Noland, 1937 (Ciliophora, Litostomatea) inferred from primary SSU rRNA gene sequences and predicted secondary rRNA structure // European Journal of Protistology. 2010. Vol. 46, № 4. P. 280 – 288.

322. Zhang X., Duan J.Y., Wang Z.Q., Jiang P., Liu R.D., Cui J. Using the small subunit of nuclear ribosomal DNA to reveal the phylogenetic position of the plerocercoid larvae of *Spirometra* tapeworms // Experimental Parasitology. 2017. Vol. 175. P. 1 – 7.

323. Zhao G.H., Li J., Mo X.H., Li X.Y., Lin R.Q., Zou F.C., Weng Y.B., Song H.Q., Zhu X.Q. The second transcribed spacer rDNA sequence: an effective genetic marker for inter-species phylogenetic analysis of trematodes in the order Strigeata // Parasitology Research. 2012. Vol 111. P.1467 – 1472.

324. Zhao Y.E., Wang Z.H., Xu Y., Wu L.P., Hu L. Secondary structure prediction for complete rDNA sequences (18S, 5.8S, and 28S rDNA) of *Demodex folliculorum*, and comparison of divergent domains structures across Acari // Experimental Parasitology. 2013. Vol. 135, № 2. P. 370 – 381.

325. Zhu J., Vinothkumar K.R., Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex I // *Nature*. 2016. Vol. 536. P. 80 – 84.
326. Zikmundova J., Georgieva S., Faltynkova A., Soldanova M., Kostadinova A. Species diversity of *Plagiorchis* Luhe, 1899 (Digenea: Plagiorchiidae) in lymnaeid snails from freshwater ecosystems in central Europe revealed by molecules and morphology // *Systematic Parasitology*. 2014. Vol. 88. P. 37 – 54.
327. Zrzavy J., Mihulka S., Kepka P., Bezdek A., Tietz, D. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence // *Cladistics*. 1998. Vol. 14. P. 249 – 285.
328. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406 – 3415.
329. Zuker M., Sankoff D. RNA Secondary structures and their prediction // *Bulletin of Mathematical Biology*. 1984. Vol. 46, № 4. P. 591 – 621.
330. Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information // *Nucleic Acids Research*. 1981. Vol. 9, № 1. P. 133 – 148.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица

Список последовательностей генов и спейсерных участков рДНК Platyhelminthes (Trematoda), использованных в данном исследовании

Подотряд/ Надсемейство	Семейство	Вид	Номер доступа GenBank 18S рДНК, авторы, год публикации	Номер доступа GenBank 28S рДНК, авторы, год публикации
Echinostomata/ Echinostomatoidea	Fasciolidae	<i>Fascioloides magna</i>	EF051080 (Bildfell et al., 2007)	–
		<i>Fasciolopsis buski</i>	L06668 (Blair, Barker, 1999)	–
	Echinostomatidae	<i>Isthmiophora hortensis</i>	AB189982 (Sato et al., 2009)	–
		<i>E. melis</i>	AY222131 (Olson et al., 2014)	–
		<i>Drepanocephalus spathans</i>	JN993268 (Griffin et al., 2012)	–
	Philophthalmidae	<i>Philophthalmus gralli</i>	JX121231 (Literak et al., 2014)	–
	Echinoasmatidae	<i>Echinochasmus japonicus</i>	LT904764 (Voronova, Chelomina, 2018)	–
		<i>E. milvi</i>	LT904765 (Voronova, Chelomina, 2018)	–
Psilostomatidae	<i>Sphaeridiotrema monorchis</i>	LT904763 (Voronova, Chelomina, 2018)	–	
Pronocephalata	Pronocephaloidea Notocotylidae	<i>Notocotylus intestinalis</i>	LT904762 (Voronova, Chelomina, 2018)	–
		<i>N. pacifera</i>	AY245765 (Flowers et al., 2004)	–
	Paramphistomoidea Paramphistomidae	<i>Paramphistomum cervi</i>	KJ459938 (Zheng et al., 2014)	–
Haplospalchnata Haplospalchnoidea Haplospalchnidae		<i>Haplospalchnus pachysomus</i>	FJ211224 (Blasco-Costa et al., 2017)	–

Xiphidiata//Haploporoidea	Haploporidae	<i>Forticulcita gibsoni</i>	FJ211226 (Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>Dicrogaster contracta</i>	FJ211256 (Blasco-Costa et al., 2010)	–
		<i>D. perpusilla</i>	FJ211230 (Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>Ragaia lizae</i>	FJ211231(Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>Haploporus benedeni</i>	FJ211228 (Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>Saccocoelium obesum</i>	FJ211253-54 (Blasco-Costa et al., 2010)	–
		<i>S. brayi</i>	FJ211227 (Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>S. cephalii</i>	FJ211232 (Blasco-Costa et al., 2017)	–
		<i>S. tensum</i>	FJ211251 (Blasco-Costa et al., 2010)	–
	<i>Hapladena nasonis</i>	AY222146 (Olson et al., 2014)	–	
Atractotrematidae	<i>Pseudomegasolena ishigakiense</i>	AJ287569 (Littlewood, Olson, 2001)	–	
	<i>Atractotrema sigani</i>	AJ287479 (Cribb et al., 2001)	–	
Xiphidiata//Gorgoderoidea	Gorgoderidae	<i>Nagmia floridensis</i>	AY222145 (Olson et al., 2014)	–
		<i>Gorgodera sp.</i>	AJ287518 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>Degeneria halosauri</i>	AJ287497 (Littlewood, Olson, 2001)	–
	Troglotrematidae	<i>Nanophyetus japonensis</i>	LT796167-LT796168 (Voronova, Chelomina, 2018)	LT796169 – LT796170 (Voronova, Chelomina, 2018)
		<i>N. schikhobalowi</i>	LT745948-LT745949, LN871816-LN871817, MG966185-MG966186 (Voronova et al., 2017)	LN871818 – LN871821, MG966187 – MG966188 (Voronova et al., 2017)
		<i>N. salmincola</i>	KX990278–KX990282, AY222138 (Olson et al.,2003)	AY116873 (Olson et al., 2003)
		<i>Skrjabinophyetus neomidis</i>	–	AF184252 (Tkach et al., 2000)
		<i>Nephrotrema truncatum</i>	–	AF151936 (Tkach et al., 2000)
	Paragonimidae	<i>Paragonimus kellicotti</i>	HQ900670 (Curtis, Fisher, 2010)	
		<i>P. heterotremus</i>	KF781295 (Tandon, Athokpam, 2013); LT855188 (Voronova, Chelomina, 2018)	KF781294 (Tandon, Athokpam, 2013)

Xiphidiata//Gorgoderoidea	Paragonimidae	<i>P. pseudoheterotremus</i>	HM004210 (Thaenkham et al., 2008)	–
		<i>P. iloktsuenensis</i>	AY222141 (Olson et al., 2003)	AY116875 (Olson et al., 2003)
		<i>P. ohirai</i>	–	HM172621 (Devi et al., 2010)
		<i>P. miyazakii</i>	AY222141 (Olson et al., 2003)	HM172620 (Devi et al., 2010)
		<i>P. siamensis</i>	–	JQ322628, JN656178 (Devi et al., неопубл. данные)
		<i>P. westermani</i>	AY222140 (Olson, 2003); AJ287556 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>P. vietnamiensis</i>	LT855189 (Voronova, Chelomina, 2018)	–
	Dicrocoeliidae	<i>Eurytrema pancreaticum</i>	KY490004 (Su et al., 2014); DQ401034 (Zheng et al., 2007)	–
		<i>E. coelmaticum</i>	DQ401035 (Zheng et al., 2007)	–
		<i>Lyperosomum collurionis</i>	AY222143 (Olson et al., 2014)	–
		<i>Brachylecithum lobatum</i>	AY222144 (Olson et al., 2014)	–
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>		Y11236 (Sandoval et al., 1997)	–	
Xiphidiata//Allocreadioidea	Allocreadiidae	<i>Allocreadium neotenicum</i>	JX983204 (Bray et al., 2013)	–
		<i>Crepidostomum cooperi</i>	EF202097 (Choudhury et al., 2007)	–
	Brachycladiidae	<i>Brachycladium goliath</i>	KR703279 (Briscoe et al., 2016)	–
		<i>Nasitrema globicephalae</i>	AJ004968 (Fernandez et al., 2003)	–
		<i>Zalophotrema hepaticum</i>	AJ224884 (Fernandez et al., 1998)	–
	Opecoelidae	<i>Biospeedotrema jolliveti</i>	KF733988 (Bray et al., 2014)	–
		<i>Anomalotrema koiae</i>	KU320582 (Bray et al., 2014)	–

Xiphidiata// Allocreadioidea	Opecoelidae	<i>Helicometra boseli</i>	KU320587 (Bray et al., 2016)	–
		<i>Hamacreadium mutabile</i>	KU320588 (Bray et al., 2016)	–
		<i>Macvicaria macassarensis</i>	AJ287533 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>Allopodocotyle epinepheli</i>	KU320585 (Bray et al., 2016)	–
		<i>Pedunculacetabulum inopinipugnus</i>	MF805699 (Martin et al., 2017)	–
		<i>Peracreadium idoneum</i>	AJ287558 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>Maculifer sp.</i>	AY222109 (Olson et al., 2014)	–
		<i>Propycnadenoides philippinensis</i>	KU320591 (Bray et al., 2016)	–
		<i>Opecoelidae sp.</i>	AY218105 (Giribet et al., 2016)	–
		<i>Allopodocotyle margolisi</i>	KU320583 (Bray et al., 2016)	–
		<i>Buticulotrema thermichthysi</i>	KF733987 (Bray et al., 2014)	–
		<i>Gaevskajatrema halosauropsi</i>	AJ287514 (Littlewood, Olson, 2001)	–
Xiphidiata// Plagiorchioidea	Encyclometridae	<i>Polylekithum ictaluri</i>	EF202096 (Choudhury et al., 2007)	–
	Plagiorchiidae	<i>Glyphelmins quieta</i>	AJ287517 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>Skrjabinoeces similis</i>	AJ287575 (Littlewood, Olson, 2001)	–
	Omphalometridae	<i>Rubensrema exasperatum</i>	AJ287572 (Littlewood, Olson, 2001)	–
	Brachycoeliidae	<i>Brachycoelium salamandrae</i>	AY222160 (Olson et al., 20014)	–
		<i>Mesocoelium sp</i>	AJ287536 (Littlewood, Olson, 2001)	–

	Telorchidae	<i>Opisthioglyphe ranae</i>	AY222157 (Olson et al., 20014)	—
		<i>Telorchis assula</i>	AY222156 (Olson et al., 20014)	—
	Cephalogonimidae	<i>Cephalogonimus retusus</i>	AJ287489 (Littlewood, Olson, 2001)	—
	Haematoloechidae	<i>Haematoloechus longiplexus</i>	AJ287520 (Littlewood, Olson, 2001)	—
	Auridistomidae	<i>Auridistomum chelydrae</i>	AY222159 (Olson et al., 20014)	—
	Macroderoididae	<i>Macroderoides typicus</i>	AY222158 (Olson et al., 20014)	—
	Choanocotylidae	<i>Choanocotyle hobbsi</i>	AY116868 (Platt, Tkach, 2003)	—
		<i>C. nematoides</i>	AY116867 (Platt, Tkach, 2003); EU196359, EU196357 (Tkach, Snyder, 2007)	—
	Renicolidae	<i>Renicola sp.</i>	AY222155 (Olson et al., 20014)	—
	Pachypsolidae	<i>Pachypsolus irroratus</i>	AJ287554 (Littlewood, Olson, 2001)	—
Xiphidiata/Micropalloidea	Zoogonidae	<i>Zoogonoides viviparus</i>	AY525634 (Struck, Purschke, 2005); AJ287590 (Littlewood, Olson, 2001)	—
		<i>Lepidophyllum steenstrupi</i>	AJ287530 (Littlewood, Olson, 2001)	—
		<i>Deretrema nahaense</i>	AJ287498 (Littlewood, Olson, 2001)	—
	Faustulidae	<i>Bacciger lesteri</i>	AJ287482 (Littlewood, Olson, 2001)	—
		<i>Antorchis pomacanthi</i>	AJ287476 (Littlewood, Olson, 2001)	—
	Lecithodendriidae	<i>Paralecithodendrium longiforme</i>	AY222148 (Olson et al., 20014)	—
		<i>Lecithodendrium linstowi</i>	AY222147 (Olson et al., 20014)	—
		<i>Lecithodendriidae sp.</i>	EU019964 (Gibson, Rikihisa, 2008)	—

Таблица (Продолжение)

Xiphidiata//Microphalloidea	Pleurogenidae	<i>Pleurogenes claviger</i>	AY222152 (Olson et al., 20014)	–
		<i>Pleurogenoides medians</i>	AY22215 (Olson et al., 20014)	–
	Prosthogonimidae	<i>Schistogonimus rarus</i>	AY222150 (Olson et al., 20014)	–
	Microphallidae	<i>Collyriclum faba</i>	JQ231122 (Heneberg, Literak, 2013)	
		<i>Microphallus fusiformis</i>	AJ287531 (Littlewood, Bray, 2003)	–
		<i>M. turgidus</i>	EU825773 (Cho et al., 2008)	–
		<i>M. primas</i>	AJ287541 (Littlewood, Olson, 2001)	–
		<i>Microphallidae sp.</i>	AB974359 (Kakui,2014)	–
<i>Maritrema oocysta</i>	AJ287534 (Littlewood, Olson, 2001)	–		
Opisthorchiata// Opisthorchioidea	Heterophyidae	<i>Euryhalmis costaricensis</i>	AB521797 – AB521800 (Sato et al., 2010)	AB521797 – AB521800 (Sato et al., 2010)
		<i>Metagonimus yokogawai</i>	HQ832632 (Thaenkham et al., 2015)	–
		<i>M. takahashii</i>	HQ832629 (Thaenkham et al., 2015)	–
		<i>Haplorchis pumilio</i>	HM004195 (Thaenkham et al., 2011)	HM004191 (Thaenkham et al., 2010)
		<i>H. taichui</i>	HM004213 (Thaenkham et al., 2011)	–
		<i>H. yokogawai</i>	HM004207 (Thaenkham et al., 2011)	–
		<i>Procerovum varium</i>	HM004200 (Thaenkham et al., 2011)	–
		<i>P. cheni</i>	HM004212 (Thaenkham et al., 2011)	–
		<i>Stellantchasmus falcatus</i>	HM004202 (Thaenkham et al., 2011)	–
	Opisthorchiidae	<i>Clonorchis sinensis</i>	AF217100 (Lee, Huh, 2009)	–
		<i>Metorchis orientalis</i>	JF314771 (Zhu, 2011)	–

Таблица (Продолжение)

	Opisthorchiidae	<i>Opisthorchis viverrini</i>	JF823987 (Thaenkham et al., 2012)	–
		<i>Amphimerus ovalis</i>	AY222121 (Olson et al., 2014)	–
	Hemiurata Hemiuroidea Hemiuridae	<i>Merluciotrema praeclarum</i>	AJ287535 (Littlewood, Olson, 2001)	–
	Diplostomata Diplostomoidea Diplostomidae	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i>	KR269766 (Brabec et al., 2015)	KR269766 (Brabec et al., 2015)
		<i>D. phoxini</i>	AY222090 (Olson et al., 2014)	–
	Aporocotylidae	<i>Neoparacardicola nasonis</i>	AY222097 (Olson et al., 2014)	–
Diplostomata// Schistosomatoidea	Shistosomatidae	<i>Trichobilharzia ocellata</i>	–	AY157243 (Lockyer et al., 2003)
		<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	–	AY157241 Lockyer et al., 2003)
		<i>Schistosoma malayensis</i>	–	AY157252 (Lockyer et al., 2003)
		<i>S. haematobium</i>	–	AY157263 (Lockyer et al., 2003)
		<i>S. japonicum</i>	–	Z46504 (Lockyer et al., 2004)
Aspidogastridae		<i>Multicotyle purvisi</i>	AJ228785 (Littlewood et al., 2000)	–
		<i>Aspidogaster conchicola</i>	AJ287478 (Littlewood, Olson, 2001)	–

Примечание: Номера для последовательностей, секвенированных нами в настоящей работе, обозначены жирным шрифтом.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Таблица

Список последовательностей гена *nad1* мтДНК Platyhelminthes (Trematoda), использованных в данном исследовании

Подотряд	Семейство	Вид	Номер доступа GenBank, авторы, год публикации
Echinostomata	Fasciolidae	<i>Fasciola gigantica</i>	KF543342 (Liu et al., 2014)
		<i>F. hepatica</i>	AF216697 (Le et al., 2016)
		<i>F. jacksoni</i>	KX787886 (Le et al., 2017)
		<i>Fascioloides magna</i>	KU060148 (Ma et al., 2016)
	Echinostomatidae	<i>Echinostoma hortense</i>	KR062182 (Liu et al., 2016)
Xiphidiata	Paragonimidae	<i>Paragonimus westermani</i>	AF219379 (Agatsuma, Iwagami, 2016); KM280646 (Narain et al., 2015)
		<i>P. ohirai</i>	KX765277 (Le et al., 2016)
	Troglotrematidae	<i>Nanophyetus japonensis</i>	LT796187-LT796200 (Voronova, Chelomina, 2018)
		<i>N. schikhobalowi</i> (полноразмерный ген и неполные последовательности)	LT555380-LT555399, LT797797-LT797812, LT985350-LT985359, MH319388 (Воронова, Челомина, 2018)
		<i>N. salmincola</i>	AY269600-AY269690 (Criscione, Blouin, 2004)
Opisthorchiata	Heterophyidae	<i>Metagonimus yokogawai</i>	KC330755 (Jeon et al., 2013)
		<i>Haplorchis taichui</i>	KF214770 (Lee et al., 2014)
		<i>Metorchis orientalis</i>	KT239342 (Na et al., 2016)
	Opisthorchiidae	<i>Clonorchis sinensis</i>	JF729303 (Cai et al., 2012); DQ116944 (Le et al., 2016)
Opisthorchiata	Opisthorchiidae	<i>Opisthorchis felineus</i>	EU921260 (Shekhovtsov et al., 2016)
		<i>O. viverrini</i>	JF739555 (Cai et al., 2012)

Примечание: Номера для последовательностей, секвенированных нами в настоящей работе обозначены жирным шрифтом.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Таблица

Список полноразмерных последовательностей гена *nad1* мтДНК разных видов рыб, использованных в данном исследовании

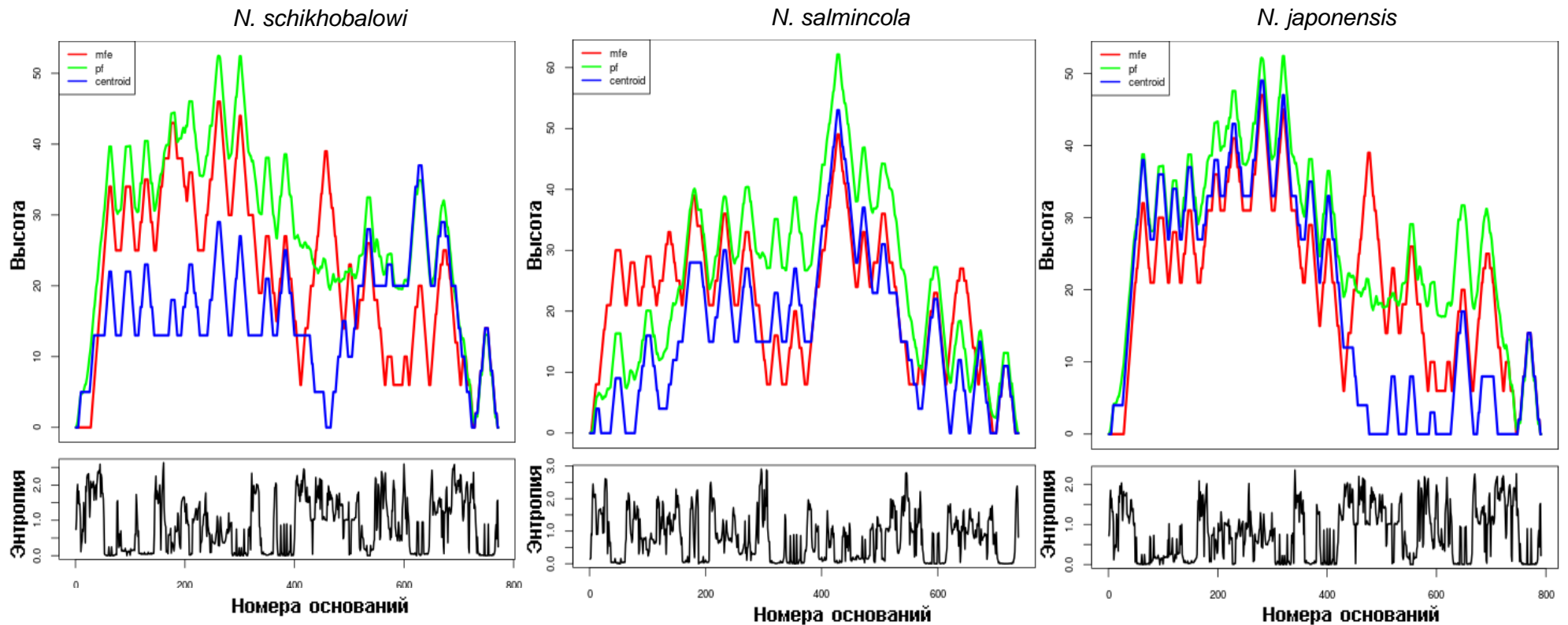
Отряд	Семейство	Виды	GenBank номер доступа	Автор/год
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Oncorhynchus keta</i> (chum salmon) – кета	NC017838	Garvin et al., 2010
		<i>O. gorbuscha</i> (pink salmon) – горбуша	EF455489	Lee et al., 2016
		<i>O. nerka</i> (sockeye salmon) – нерка	EF055889	Hsieh et al., 2016
		<i>O. masou masou</i> (cherry salmon) – сима	DQ864465	Chang et al., 2016
		<i>O. clarkii henshawi</i> (lahontan cutthroat trout) – Лахонтанский лосось Кларка	AY886762	Brown et al., 2016
		<i>O. mykiss</i> (rainbow trout) – радужная форель	LC050735	Song et al., 2015
		<i>O. kisutch</i> (coho salmon) – кижуч	EF126369	Hsieh et al., 2016
		<i>O. tshawytscha</i> (chinook salmon) – чавыча	AF392054	Bernales et al., 2016
		<i>Salvelinus fontinalis</i> (brook trout) – ручьевая форель	NC000860	Doiron et al., 2010
		<i>S. leucomaenis</i> (whitespotted char) – кунджа	NC022844	Zhang et al., 2013
		<i>Brachymystax lenok</i> (lenok trout) – ленок	NC018341	Si et al., 2012
		<i>Hucho taimen</i> (taimen) – таймень	KJ711550	Balakirev et al., 2014
		<i>Thymallus thymallus</i> (grayling) – хариус	NC012928	Yasuike et al., 2010
		<i>Coregonus ussuriensis</i> (amur whitefish) – амурский сиг	NC025648	Xue et al., 2014
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Phoxinus oxycephalus</i> (chinese minnow) – китайский гольян	NC027273	Sui et al., 2015
		<i>P. steindachneri</i> (common fat-minnow) – обыкновенный гольян	AP009148	Imoto et al., 2013
		<i>Tribolodon hakonensis</i> (big-scaled redfin) – крупночешуйная краснопёрка	AB626855	
		<i>Richardsonius balteatus</i> (redside shiner) – краснобокий ричардсониус	AP012106	Miya, 2017
Perciformes	Cottidae	<i>Mesocottus haitej</i> (amur sculpin) – амурский бычок	NC022181	Shedko et al., 2013
Esociformes	Umbridae	<i>Dallia pectoralis</i> (alaska blackfish) – даллия	AP004102	Ishiguro et al., 2012
		n=20		

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Рисунок

Диаграммы «Mountain plot», характеризующие MFE-структуры ITS1 *Nanophyetus* spp. и графики энтропии для выровненных последовательностей, представляющие меру изменчивости в данной нуклеотидной позиции.

mfe – структура с минимальной свободной энергией, pf – термодинамический потенциал системы, centroid – центроидная структура. Высота определяется количеством оснований в данном энергетическом положении. Плато на графиках соответствует петлям на моделях вторичных структур, уклон – спиральям.

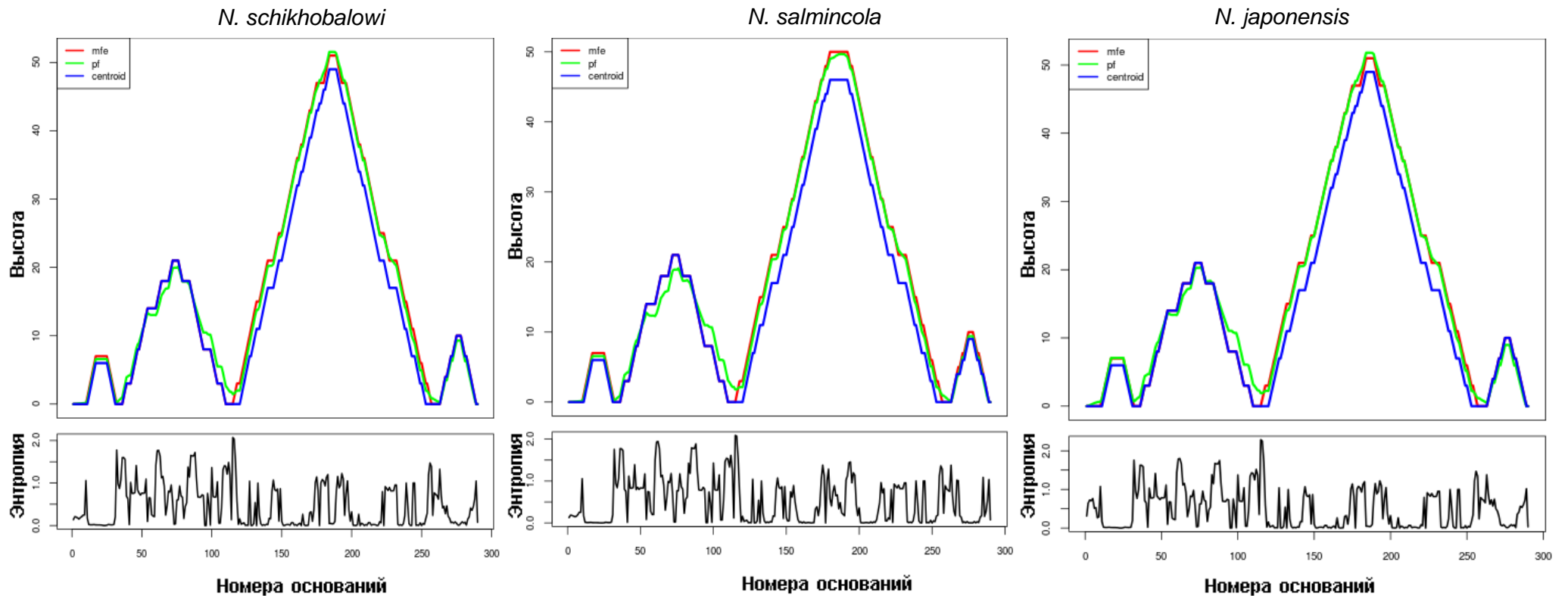


ПРИЛОЖЕНИЕ V

Рисунок

Диаграммы «Mountain plot», характеризующие MFE-структуры ITS2 *Nanophyetus* spp. и графики энтропии для выровненных последовательностей, представляющие меру изменчивости в данной нуклеотидной позиции.

mfe – структура с минимальной свободной энергией, pf – термодинамический потенциал системы, centroid – центроидная структура. Высота определяется количеством оснований в данном энергетическом положении. Плато на графиках соответствует петлям на моделях вторичных структур, уклон – спиральям.



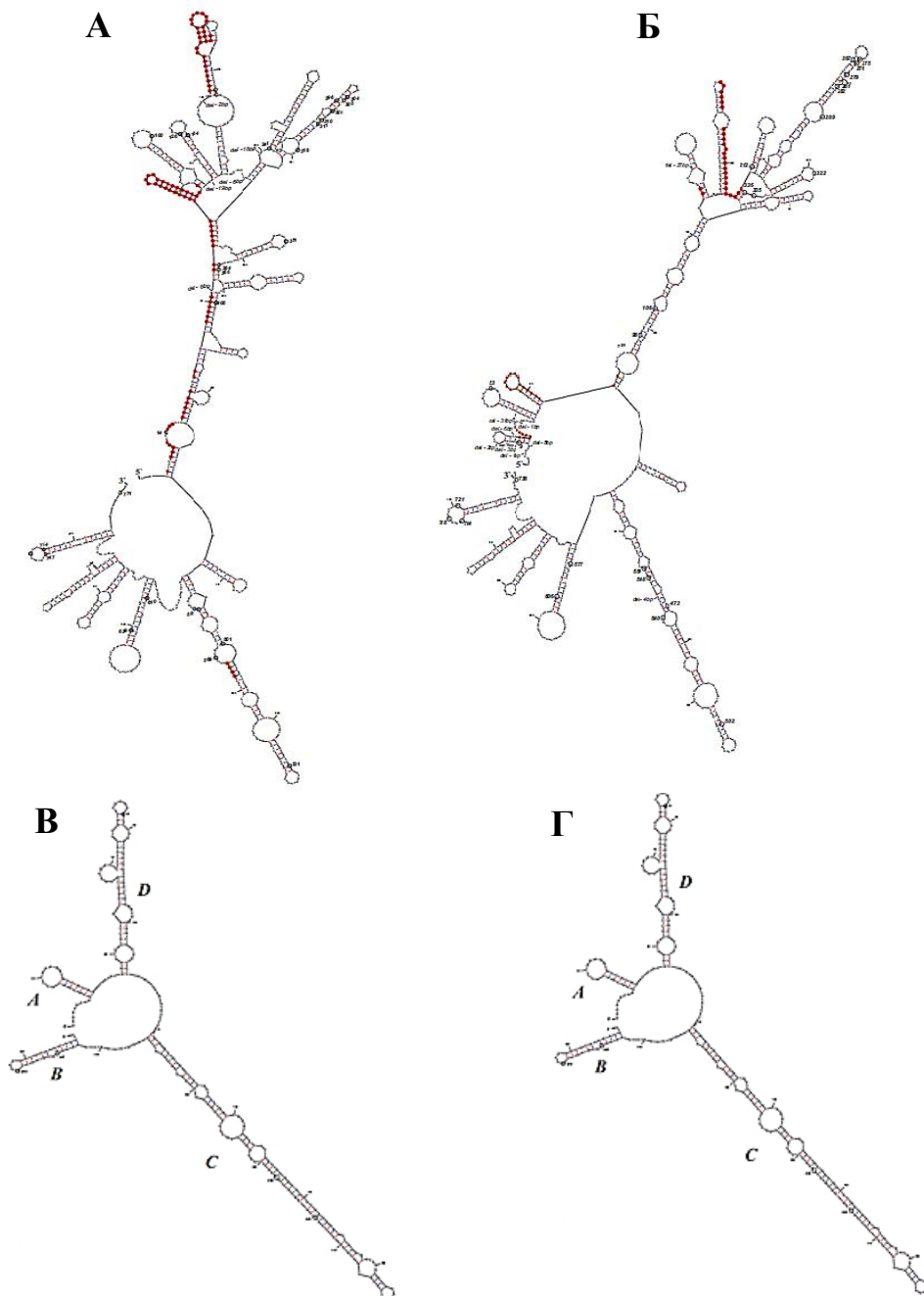
ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Рисунок

Вторичные структуры, смоделированные *de novo* в программе Mfold:

ITS1 для *N. schikhobalowi*, с минимальной свободной энергией -241, 2 ккал/моль (А), для *N. salmincola*, с минимальной свободной энергией -237, 3 ккал/моль (Б);

ITS2 для *N. schikhobalowi*, с минимальной свободной энергией -94, 0 ккал/моль (Mfold) (В), для *N. salmincola*, с минимальной свободной энергией -95, 4 ккал/моль (Г).



ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Таблица

Средние частоты кодонов неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК*Nanophyetus* spp.

Кодон	<i>N. schikhobalowi</i>	<i>N. salmincola</i>	<i>N. japonensis</i>
UUU (F)	15 (1,67)	15 (1,76)	18 (0,89)
UUC (F)	3 (0,33)	2 (0,24)	1 (0,11)
UUA (L)	12 (2,06)	9 (1,54)	10 (1,71)
UUG (L)	9 (1,54)	11 (1,89)	12 (2,06)
CUU (L)	4 (0,69)	10 (1,71)	5 (0,86)
CUC (L)	2 (0,34)	2 (0,34)	1 (0,17)
CUA (L)	5 (0,86)	2 (0,34)	4 (0,69)
CUG (L)	3 (0,51)	1 (0,17)	3 (0,51)
AUU (I)	7 (1,62)	5 (1,67)	4 (1,00)
AUC (I)	0 (0,00)	1 (0,33)	2 (0,50)
AUA (I)	6 (1,38)	3 (1,00)	6 (1,50)
AUG (M)	3 (1,00)	3 (1,00)	3 (1,00)
GUU (V)	5 (1,18)	6 (1,2)	6 (1,50)
GUC (V)	2 (0,42)	2 (0,40)	2 (0,50)
GUA (V)	3 (0,71)	4 (0,80)	3 (0,75)
GUG (V)	7 (1,65)	8 (1,60)	5 (1,25)
UCU (S)	7 (2,43)	10 (3,64)	8 (2,56)
UCC (S)	3 (1,04)	1 (0,36)	2 (0,64)
UCA (S)	1 (0,35)	0 (0,00)	1 (0,32)
UCG (S)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
CCU (P)	1 (0,80)	4 (2,67)	1 (0,80)
CCC (P)	4 (3,20)	1 (0,67)	3 (2,40)
CCA (P)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,80)
CCG (P)	0 (0,00)	1 (0,67)	0 (0,00)
ACU (T)	1 (0,80)	1 (0,80)	2 (1,60)
ACC (T)	1 (0,80)	1 (0,80)	1 (0,80)
ACA (T)	1 (0,80)	2 (1,60)	1 (0,80)
ACG (T)	2 (1,60)	1 (0,80)	1 (0,80)
GCU (A)	4 (1,33)	6 (2,00)	5 (1,82)
GCC (A)	2 (0,67)	2 (0,67)	1 (0,34)
GCA (A)	1 (0,33)	1 (0,33)	0 (0,00)
GCG (A)	5 (1,67)	3 (1,00)	5 (1,82)
UAU (Y)	9 (2,45)	10 (2,31)	10 (2,31)
UAC (Y)	2 (0,55)	3 (0,69)	3 (0,69)
UAA (Y)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

Таблица (продолжение)

UAG (*)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
CAU (H)	1 (2,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
CAC (H)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
CAA (Q)	2 (2,00)	2 (2,00)	1 (1,00)
CAG (Q)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,00)
AAU (N)	3 (2,25)	3 (2,25)	2 (1,50)
AAC (N)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,75)
AAA (N)	1 (0,75)	1 (0,75)	1 (0,75)
AAG (K)	5 (1,00)	4 (1,00)	4 (1,00)
GAU (D)	2 (2,00)	2 (2,00)	2 (2,00)
GAC (D)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
GAA (E)	1 (0,25)	2 (0,50)	0 (0,00)
GAG (E)	7 (1,75)	6 (1,50)	8 (2,00)
UGU (C)	9 (1,50)	11 (1,83)	9 (1,50)
UGC (C)	3 (0,50)	1 (0,17)	3 (0,50)
UGA (W)	1 (0,20)	7 (1,27)	3 (0,60)
UGG (W)	9 (1,80)	4 (0,73)	7 (1,40)
CGU (R)	1 (1,33)	1 (1,33)	1 (1,33)
CGC (R)	1 (1,33)	0 (0,00)	1 (1,33)
CGA (R)	1 (1,33)	2 (2,67)	1 (1,33)
CGG (R)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
ACU (S)	6 (2,09)	6 (2,18)	4 (1,28)
AGC(S)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
AGA (S)	4 (1,39)	2 (0,73)	4 (1,28)
AGG (S)	2 (0,70)	3 (1,09)	6 (1,92)
GGU (G)	8 (1,78)	8 (1,68)	9 (2,00)
GGC (G)	2 (0,44)	1 (0,21)	1 (0,22)
GGA (G)	1 (0,22)	2 (0,42)	1 (0,22)
GGG (G)	7 (1,56)	8 (1,68)	7 (1,56)

Примечание: наиболее часто используемые кодоны выделены жирным шрифтом.

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

Рисунок

Трехмерные модели первой субъединицы NADH-дегидрогеназы трематод, примерно 96% последовательностей смоделировано с достоверностью 100,0%: *Echinostoma hortense* (А); *Fasciola hepatica* (Б); *Fasciola gigantica* (В); *Fascioloides magna* (Г); *Haplorchis taichui* (Д); *Metorchis orientalis* (Е); *Metagonimus yokogawai* (Ж); *Clonorchis sinensis* (З); *Opisthorchis viverrini* (И); *Paragonimus westermani* (К); *N. schikhalowi* (Л). Радужная окраска изображения N → C terminus (The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis).

