

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ИНСТИТУТ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Татонова
Юлия Викторовна

**Генетическое разнообразие патогенной для человека и животных трематоды
– китайской печеночной двуустки *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875)
(Trematoda: Opisthorchiidae)**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., проф. Челомина Г.Н.

Владивосток – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Особенности биологии <i>Clonorchis sinensis</i>	10
1.2. Ядерные и митохондриальные маркеры в генетических и филогенетических исследованиях эукариот	16
1.3. Исследование генетической изменчивости и филогенетических связей <i>C. sinensis</i>	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1. Получение паразитологического материала	32
2.2. Получение геномной ДНК	33
2.3. Амплификация отдельных последовательностей ДНК	34
2.4. Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных участков ДНК	35
2.5. Клонирование фрагмента ITS1 ядерной рДНК	36
2.6. Статистический анализ молекулярных данных	42
2.6.1. Обработка данных секвенирования	42
2.6.2. Реконструкция внутривидовых филогенетических связей	43
2.6.3. Анализ вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 ядерной рДНК	44
2.6.4. Анализ предполагаемой молекулярной организации первой субъединицы белка цитохром <i>c</i> -оксидазы мтДНК	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	45
3.1. Анализ полноразмерной последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 ядерной рДНК	45
3.1.1. Нуклеотидные последовательности участка 5.8S-ITS2 рДНК и вторичная структура транскриптов ITS2.....	45
3.1.2. Нуклеотидная изменчивость ITS1 рДНК и вторичная структура транскриптов ITS1	47

3.1.3. Внутривидовые филогенетические отношения по данным изменчивости полной последовательности ITS1 рДНК	61
3.2. Анализ частичной последовательности ITS1 ядерной рДНК	65
3.2.1. Нуклеотидная изменчивость частичной последовательности участка ITS1	65
3.2.2. Внутривидовые филогенетические отношения частичной последовательности ITS1 рДНК	72
3.3. Генетическая изменчивость полноразмерной последовательности гена <i>cox1</i> мтДНК	76
3.3.1. Анализ нуклеотидных последовательностей гена <i>cox1</i>	76
3.3.2. Анализ внутривидовых филогенетических отношений по данным изменчивости гена <i>cox1</i> мтДНК	85
3.3.3. Историко-демографический анализ популяций <i>C. sinensis</i> по данным изменчивости гена <i>cox1</i> мтДНК	89
3.4. Генетическая изменчивость частичной последовательности гена <i>cox1</i> мтДНК	91
3.4.1. Анализ частичных нуклеотидных последовательностей гена <i>cox1</i>	91
3.4.2. Внутривидовая филогения и филогеография <i>C. sinensis</i> по данным изменчивости фрагмента гена <i>cox1</i> мтДНК	97
3.4.3. Историко-демографический анализ популяций <i>C. sinensis</i> по данным изменчивости частичных последовательностей гена <i>cox1</i> мтДНК	99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	103
4.1. Генетическая изменчивость ядерного маркера ITS1-5.8S-ITS2 рДНК ...	103
4.2. Генетическая изменчивость последовательностей гена <i>cox1</i> мтДНК	109
ВЫВОДЫ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875), или китайская печеночная двуустка, является одним из эпидемиологически наиболее важных зоонозных паразитов Восточной и Юго-Восточной Азии (Mas-Coma, Bargues, 1997; Chai et al., 2005; Keiser, Utzinger, 2009). Более 35 миллионов людей в мире инфицировано возбудителем клонорхоза, и более 200 миллионов находятся в группе риска (Lun et al., 2005; Fürst et al., 2012; Hong, Fang, 2012). Китайская печеночная двуустка оказывает влияние на печень, желчные протоки и общее состояние хозяина, а также может приводить к развитию холангиокарциномы (Choi et al., 2004). Данный вид официально внесен в список канцерогенов биологического происхождения (Bouvard et al., 2009).

В настоящее время влияние возбудителя клонорхоза на здоровье человека значительно возросло в связи импортом из эндемичных районов свежей, замороженной или высушенной пресноводной рыбы (Fried et al., 2004; Stauffer et al., 2004). Помимо этого, на эпидемиологическую ситуацию оказывает влияние развитие туризма, увеличение иммиграции населения из Восточной и Юго-Восточной Азии и интереса европейцев к экзотической восточной кухне, в частности, к блюдам из термически необработанной рыбы.

До недавнего времени считалось, что очаги клонорхоза в Приморском крае России отсутствуют. Данный вывод сделал Посохов (2004) на основе обследования более 200 диких животных на заражение *C. sinensis*. Однако в последние годы в Приморском крае зарегистрировано увеличение случаев заболевания клонорхозом. Особенно опасны источники инвазии, возникшие в рекреационных зонах в результате хозяйственной деятельности человека и случайного переноса моллюсков рода *Parafossarulus* Annadale, 1924 – первого промежуточного хозяина китайской печеночной двуустки (Беспрозванных и др., 2012).

В отличие от России, во Вьетнаме, особенно в северных и центральных провинциях, отмечается высокая зараженность *C. sinensis* местного населения и

домашних животных (Нго, Ермоленко, 2011; Nontasut et al., 2003; Dung et al., 2007; Нор et al., 2007; Clausen et al., 2012). Кроме этого, на увеличение случаев клонорхоза влияет развитие аквакультуры во Вьетнаме. Сельскохозяйственную рыбу выращивают в прудах, заселенных первыми промежуточными хозяевами паразита (пресноводными моллюсками) и загрязняющихся постоянным сбросом фекальных отходов дефинитивных хозяев (человека и домашних животных). Искусственное поддержание жизненного цикла *C. sinensis* увеличивает риск заражения клонорхозом (Clausen et al., 2012).

Для понимания биологии паразита, его биогеографии и создания основы для лечения, контроля и прогностических оценок распространения инвазии важно изучение его генетического разнообразия. Изучение генетической изменчивости *C. sinensis* из России и Вьетнама позволяет охарактеризовать северную и южную границы ареала данного вида. Помимо этого, филогеографические данные могут быть применены для реконструкции истории колонизации, миграционных маршрутов и оценки времени популяционной экспансии паразита (Criscione et al., 2005). Определение полноразмерных первичных ядерных и митохондриальных последовательностей ДНК, а также моделирование вторичных структур транскриптов рДНК и анализ функциональных сайтов белковых молекул могут объяснить некоторые особенности паразита, например, высокую устойчивость *C. sinensis* из Вьетнама к празиквантелу и другим противогельминтным лекарственным средствам (Tinga et al., 1999).

Степень разработанности. Несмотря на эпидемиологическое значение *C. sinensis*, генетическая изменчивость данного вида исследована недостаточно. Внутривидовая изменчивость в основном изучалась с использованием частичных последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК (Park, Yong, 2001; Lee, Nuh, 2004; Park, 2007; Liu et al., 2012), а также комбинированных фрагментов маркерных последовательностей при мультилокусном подходе (Sun et al., 2013). При этом полноразмерные последовательности обычно не использовались, несмотря на то, что они могут более достоверно описать популяционно-

генетическую структуру исследуемого вида. Также не изучена генетическая структура популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама.

Цель и задачи исследования. Цель работы – оценить генетическое разнообразие высокопатогенной для человека и животных китайской печеночной двуустки *C. sinensis* с помощью молекулярных маркеров ядерной и митохондриальной ДНК. Основные задачи исследования:

1. Получить полноразмерные последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК и митохондриального гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (*cox1*) для популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама.

2. По данным нуклеотидной изменчивости последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК и *cox1* мтДНК оценить уровень генетического полиморфизма и дифференциации локальных и региональных популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама.

3. С учетом данных генного банка по обоим молекулярным маркерам сравнить генетическое разнообразие популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама между собой и с генетическим разнообразием популяционных выборок из Китая и Кореи.

4. Выполнить моделирование вторичных структур для транскриптов спейсерных областей ITS1 и ITS2 рДНК и схемы третичной структуры для прогнозируемых аминокислотных последовательностей белка COX1.

5. Реконструировать внутривидовые филогенетически связи и провести историко-демографический анализ популяций *C. sinensis*.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование генетического разнообразия популяций *C. sinensis* из России и Вьетнама с использованием полноразмерных нуклеотидных последовательностей ядерной (ген 5.8S и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 рибосомного кластера) и митохондриальной (ген *cox1*) ДНК. Обобщены и проанализированы имеющиеся в генном банке данные для вида по перечисленным маркерам. Показано, что уровни генетического разнообразия российских и вьетнамских популяций сопоставимы между собой, но существенно ниже, чем у популяций

C. sinensis из Китая. По данным нуклеотидного полиморфизма маркеров показано отсутствие статистически достоверной дифференциации между локальными и региональными выборками, что свидетельствует о популяционной панмиксии вида. В распределении частот гаплотипов и нуклеотидного разнообразия вдоль гена *cox1* и спейсерной последовательности ITS1 выявлен четкий географический вектор (с севера на юг). Характер распределения генетического разнообразия *C. sinensis* указывает на локальную адаптацию паразита к условиям окружающей среды и связь между особенностями молекулярной организации последовательностей ITS1 и *cox1* с инвазивными способностями и лекарственной устойчивостью китайской печеночной двуустки. Обнаружен внутригеномный полиморфизм участков ITS1 и ITS2 рДНК и наличие в ITS1 CG-богатых регуляторных (энхансерных) мотивов. Выполнено моделирование вторичных структур для транскриптов ITS1 и ITS2, а также предложена схема третичной структуры белка COX1. Филогенетический и историко-демографический анализы предполагают формирование региональных филогенетических линий *C. sinensis* на территории центрального Китая в среднем плейстоцене, популяционную экспансию в позднем плейстоцене и отсутствие событий генетического бутылочного горлышка в недавней истории вида. Практически все полученные в работе результаты являются новыми и приоритетными.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты важны для понимания микроэволюционных процессов, происходящих в геноме *C. sinensis*, и филогеографии вида, паразито-хозяйинных отношений и способности развивать лекарственную устойчивость, а также для прогнозирования эпидемиологической ситуации по клонорхозу в условиях глобальных климатических изменений.

Методология и методы диссертационного исследования. В настоящей работе для описания генетического разнообразия *C. sinensis* определены первичные нуклеотидные последовательности ядерной и митохондриальной ДНК. Помимо этого, для подтверждения результатов прямого секвенирования использовано молекулярное клонирование. Полученные данные обработаны с

помощью современных статистических программ. Кроме того, проведено моделирование вторичных структур транскриптов рДНК с поиском длинных и коротких повторов, а также анализ функциональных сайтов предполагаемой молекулы белка COX1.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности генетического разнообразия полноразмерных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК *C. sinensis* коррелируют с напряженностью эпидемиологической ситуации.

2. Полученные результаты указывают на глубокую локальную адаптацию паразита.

3. Генетическое разнообразие краевых популяций *C. sinensis* сопоставимо между собой и отличается от данных для китайской выборки.

4. Филогенетический и историко-демографический анализы на основе использованных маркеров дали представление об истории колонизации паразита.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярных методов и статистической обработки полученных результатов, проведением повторов эксперимента с использованием положительных и отрицательных контрольных проб, а также применением молекулярного клонирования. Для анализа были использованы выборки одинакового размера из всех исследуемых локалитетов, а также привлечены последовательности из генного банка базы данных NCBI. Для подтверждения результатов исследования приведены табличные данные, диаграммы, филогенетические реконструкции и модели.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международных конференциях «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы», г. Москва (2011); «Modern achievements in population, evolutionary, and ecological genetics: International symposium», г. Владивосток (2011, 2013); конференциях-конкурсах молодых ученых БПИ ДВО РАН, г. Владивосток (2011, 2012, 2013, 2014) и 4-й международной конференции «Molecular Phylogenetics», г. Москва (2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 146 страницах, иллюстрирована 30 рисунками и содержит 14 таблиц. Список литературы насчитывает 229 наименований, из них 209 на иностранном языке.

Благодарности. Автор искренне благодарна научному руководителю д.б.н., профессору Г.Н. Челоминой за обучение, поддержку на всех этапах работы и ценные советы, заведующему лаборатории паразитологии БПИ д.б.н. В.В. Беспрозванных за предоставленный материал и помощь в подготовке диссертации, вьетнамским коллегам Н.М. Хуну и Х.З. Нго из сектора паразитологии Института экологии и биоресурсов Вьетнамской Академии Наук и Технологии (Ханой) за паразитологический материал из Вьетнама, директору БПИ ДВО РАН академику Ю.Н. Журавлеву за возможность осуществить международную командировку и сотрудникам лаборатории паразитологии к.б.н. К.В. Рожковану и к.б.н. Д.М. Атопкину за помощь в освоении методов и критические замечания. Данная работа частично выполнена при финансовой поддержке грантов ДВО РАН 11-III-D-06-014 и 12-I-06-022.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности биологии *Clonorchis sinensis*

C. sinensis паразитирует в желчных протоках печени людей и некоторых плотоядных животных, питающихся рыбой. Гораздо реже половозрелые черви инвазируют желчный пузырь или поджелудочную железу (Komiyu, Suzuki, 1964; Посохов, 2004). В экспериментальных условиях их можно обнаружить и в двенадцатиперстной кишке (Беспрозванных и др., 2013).

Систематическое положение китайской печеночной двуустки *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (по Лебедев, 1995; Ле и др., 2013):

Тип Плоские черви – Plathelminthes Gegenbaur, 1859

Класс Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808

Подкласс Дигенетические сосальщики – Digenea Carus, 1863

Отряд Opisthorchiida La Rue, 1957

Надсемейство Opisthorchioidea Looss, 1899

Семейство Opisthorchiidae Looss, 1899

Подсемейство Opisthorchiinae Looss, 1899

Род *Clonorchis* Looss, 1907.

Данный вид является одним из наиболее эпидемиологически важных гельминтов в Восточной и Юго-Восточной Азии. Случаи клонорхоза зарегистрированы во многих странах данного региона, например, в Китае, Корее, Тайване, Вьетнаме и на Дальнем Востоке России. Часто заражение человека клонорхисом происходит в крупных городах с высокой плотностью населения, поэтому все социальные классы подвержены риску (WHO, 1995; Mas-Coma, Bargues, 1997; Chai et al., 2005; Bray et al., 2008; Keiser, Utzinger, 2009). В Южной Корее среди мужского населения существует традиция поедания сырой рыбы вместе с рисовым вином (WHO, 1995). В Китае помимо сырой в пищу используют недостаточно термически обработанную рыбу. Например, кусочки рыбы помещают в кипящую воду лишь на короткое время, недостаточное для

уничтожения метацеркарий паразита (WHO, 1995). В 1982 году *C. sinensis* предположительно был обнаружен в Северной Африке. Однако данный факт не был подтвержден (Bayssade-Dufour et al., 1982: цит. по Беспрозванных и др., 2013).

Во Вьетнаме большая часть местного населения и домашних животных заражена *C. sinensis* (Нго, Ермоленко, 2011). В провинциях северной части страны (Намдинь, Ниньбинь, Тхайбинь и другие провинции) и некоторых провинциях центральной части (Тханьхоа, Нгеан) случаи заболевания людей клонорхозом встречаются чаще (Rim, 1986; Nontasut et al., 2003; Нор et al., 2007; Dung et al., 2007; www.fibozoparia1.org). Вероятно, основной причиной является то, что больше половины населения вышеперечисленных провинций Вьетнама употребляет в пищу сырую рыбу (Dung et al., 2007; Нор et al., 2007), несмотря на попытку государства распространить информацию о вреде такой привычки (www.fibozoparia1.org). Помимо этого, такая напряженная эпидемиологическая ситуация складывается в результате искусственного поддержания популяции первых промежуточных хозяев паразита (пресноводного моллюска *Parafossarulus striatulus* Benson, 1842), которые обитают на рисовых полях одновременно со вторым промежуточными хозяевами (молодь рыб из разных семейств), выращиваемыми на тех же полях. Источник инвазии сохраняется еще и потому, что население не уделяет должного внимания дегельминтизации домашних животных (Нго, Ермоленко, 2011).

В России *C. sinensis* обнаружен только на юге Дальнего Востока. Посохов в своей работе (Посохов, 2004) отмечает, что коренное население Хабаровского края регулярно употребляет сырую рыбу. Поэтому в данном регионе России регистрируют большое количество случаев клонорхоза. До недавнего времени считалось, что очаги клонорхоза отсутствуют в Приморском крае. Такой вывод был сделан на основе изучения более 200 диких животных (Посохов, 2004). Однако позже установлено (Беспрозванных и др., 2012), что за последние 20 лет в Приморском крае произошла экспансия первого промежуточного хозяина

паразита, в связи с чем в последние годы наблюдается увеличение случаев заболевания человека клонорхозом.

Строительство гидроэлектростанций и водохранилищ вызывает случайный перенос паразита в области, в которых он изначально отсутствовал. В этом случае санитарно-эпидемиологическая ситуация в регионе может ухудшиться. Например, антропогенное формирование нового очага *C. sinensis* зарегистрировано в рекреационной зоне рядом с с. Кронштадтка Приморского края, где в результате создания водохранилища в 1979 году был искусственно сформирован источник заражения клонорхозом. Причиной этого стала случайная интродукция первого промежуточного хозяина *C. sinensis* (пресноводного моллюска *Parafossarulus manchouricus* Bourguigant, 1860) с корневищем лотоса из естественных водоемов региона. Но, помимо искусственной интродукции паразита, существуют и многочисленные естественные очаги клонорхоза в Приморском крае (Беспрозванных и др., 2012).

Как и для других представителей класса Trematoda, для *C. sinensis* характерен сложный жизненный цикл со сменой промежуточных и дефинитивного хозяев, принадлежащих разным классам животных. Каждый хозяин имеет свой ареал и биологические особенности. Поэтому для успешного замыкания цикла паразита необходимо сочетание большого количества условий. Вследствие этого степень зараженности разных хозяев на одной территории может сильно варьировать.

Рассмотрим различных хозяев, которые включены в жизненный цикл китайской печеночной двуустки. Согласно одной из гипотез, моллюски были первыми хозяевами, которые появились в жизненном цикле трематод (Гинецинская, 1968). Соответственно, длительные коэволюционные процессы паразита и его хозяев привели к уменьшению количества представителей первого промежуточного хозяина для одного паразита. Так, например, виды рода *Opisthorchis* Blanchard, 1895 являются паразитами только одного рода пресноводных моллюсков – *Bithynia* Leach, 1818. Однако по литературным данным *C. sinensis* паразитирует у большого количества видов первых

промежуточных хозяев, принадлежащих к разным семействам. Так, например, только в китайских провинциях для китайской печеночной двуустки обнаружено 7 видов хозяев-моллюсков (*Assiminea lutea* A. Adams, 1861; *Bithynia fuchsianus* Moellendorff, 1888; *B. robusta* H. Adams, 1870; *B. (Alocinma) longicornis* Benson, 1842; *Parafossarulus striatulus* Benson, 1842; *Semisulcospira cancellata* Benson, 1833; *Melanoides tuberculata* Muller, 1774), принадлежащих к 5 различным семействам (Assimineidae Adams & Adams, 1856; Bithyniidae Gray, 1857; Hydrobiidae Simpson, 1865; Melaniidae Children, 1823 и Thiaridae Troschel, 1857) (Lun et al., 2005). В различных работах указано, что во Вьетнаме *C. sinensis* паразитирует у некоторых представителях вышеперечисленных моллюсков (De, 2004; Hung et al., 2013a). Однако при исследовании 8 видов моллюсков из двух провинций северного Вьетнама (провинция Намдинь, уезд Нгиахынг и провинция Ниньбинь, уезд Кимшон) на зараженность *C. sinensis* Нго и Ермоленко (2011) обнаружили партеногенетическую стадию паразита только у *Parafossarulus striatulus*. При этом выборка содержала почти 15 тысяч представителей пресноводных моллюсков. Помимо этих видов в качестве первого промежуточного хозяина на Дальнем Востоке России описывают виды *Parafossarulus manchouricus* Bourguignat, 1860 и *P. spiridonovi* Zatravkin et Starobogatov, 1989 (Bithyniidae) (Посохов, 2004; Беспрозванных и др., 2012).

Вторыми промежуточными хозяевами клонорхиса являются преимущественно представители рыб семейства Cyprinidae Obrhelova, 1969. Более 100 видов пресноводных рыб инфицируются церкариями *C. sinensis* (Adams et al., 1997; WHO, 1995). Лунь с соавторами (Lun et al., 2005) приводят более точную цифру – 132 вида, которые участвуют в циркуляции китайской печеночной двуустки, из них 71 вид принадлежит семейству Cyprinidae. Во Вьетнаме главную роль в распространении клонорхоза имеет белый толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844. Помимо этого, еще 5 видов играют существенную роль в качестве второго промежуточного хозяина китайской печеночной двуустки: рыба-ползун *Anabas testudineus* Bloch, 1795; карп *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758; ильный карп *Cirrhina molitorella* Valenciennes, 1844; черный амур

Mylopharyngodon piceus Richardson, 1846 и мозамбикская тиляпия *Tilapia mossambica* Peters, 1852 (De, 2004). Указанный в работе обыкновенный карась *Carassius carassius* Linnaeus, 1758 является европейским и не может принимать участие в циркуляции *C. sinensis*.

На юге Дальнего Востока России значительный вклад в поддержание очагов клонорхоза вносят амурский чебачок *Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel, 1846, обыкновенный горчак *Rhodeus sericeus* Pallas, 1776 и озерный маньчжурский голянь *Phoxinus phoxinus manschuricus* Berg, 1907. Однако обычно употребляемые в пищу рыбы (амурский сазан *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel, 1846 и серебряный карась *Carassius gibelio* Bloch, 1782) имеют низкий уровень зараженности метацеркариями. Это происходит вследствие того, что местообитания первых и вторых промежуточных хозяев не совпадают. Также источником заражения может служить обыкновенный верхогляд *Chanodichthys erythropterus* Basilewsky, 1855 и другие представители карповых (Посохов, 2004; Беспрозванных и др., 2012; Беспрозванных и др., 2013).

C. sinensis паразитирует как у диких, так и домашних животных, например, кошек, собак, свиней и кроликов (Посохов, 2004; Lun et al., 2005). Различные животные могут иметь определенное значение в формировании очагов трематодозов, поэтому по дефинитивным хозяевам выделяют природные (дикие животные), антропические (домашние животные и человек) и смешанные очаги клонорхоза (Беспрозванных и др., 2013).

Первые и вторые промежуточные, а также дефинитивные хозяева формируют условия для циркуляции *C. sinensis*.

Заражение окончательных хозяев возбудителем клонорхоза происходит через поедание сырой или недостаточно термически обработанной рыбы. Более 35 миллионов людей в мире инфицированы китайской двуусткой (15 миллионов из них приходится на Китай), и более 200 миллионов находятся в группе риска (Lun et al., 2005; Hong, Fang, 2012). Пресноводная рыба является ценным источником белка. В связи с этим в конце XX века на территории юго-восточной Азии объем аквакультуры данных рыб вырос экспоненциально. Так, например, за

период с 1962 по 2002 гг. во Вьетнаме количество культивируемой рыбы увеличилось практически в 10 раз (Keiser, Utzinger, 2005). Данный факт не мог не отразиться на эпидемиологической ситуации в странах-эндемиках. Миграция населения из стран, эндемичных по клонорхозу, а также посещение этих регионов туристами, проявляющих интерес к экзотической восточной кухне, вносят дополнительный риск заражения клонорхозом (WHO, 1995).

Зоны заражения человека и животных зачастую не совпадают, что может быть следствием многих причин. Например, в бедных районах Китая стоимость рыбы высока, и скармливать ее кошкам и собакам очень невыгодно. Поэтому при высокой степени зараженности населения инфицирование клонорхозом домашних животных относительно небольшое. Важны и социокультурные аспекты инфицирования *C. sinensis*. Так в крупных городах Вьетнама заражение женщин гораздо ниже, чем мужчин. Последние гораздо чаще питаются в ресторанах, где используют в пищу сырую и даже живую рыбу (Grove, 1990).

Достаточно высокий уровень инвазии китайской печеночной двуусткой зачастую приводит к инвалидности и смерти человека в результате патологических изменений в печени и желчных протоках. При этом паразит оказывает воздействие на эти органы механически или посредством продуктов своей жизнедеятельности (Круглякова и др., 1987; Посохов и др., 1987; Mas-Coma, Bargues, 1997). Например, *C. sinensis* может спровоцировать образование камней в желчевыводящих протоках и в желчном пузыре. В особенно тяжелых формах может поражаться поджелудочная железа (WHO, 1995). Кроме того, паразит может быть причиной развития рака. Хотя канцерогенный эффект *C. sinensis* был обнаружен в начале 90-х годов (Lee et al., 1993; Lee et al., 1994), этот паразит относительно недавно был внесен в список *B* биологических канцерогенов (Bouvard et al., 2009). Большое количество случаев холангиокарциномы зарегистрировано в Тайланде и крупном административном районе Китая – Гонконге (WHO, 1995).

1.2. Ядерные и митохондриальные маркеры в генетических и филогенетических исследованиях эукариот

Генетическая изменчивость является основой для действия естественного отбора. Маркеры ядерной и митохондриальной ДНК широко используются для изучения генетических процессов в популяциях, описания структуры вида и истории его возникновения, а также для выявления родственных взаимосвязей между отдельными особями или группами особей (Avisе, 2004).

На сегодняшний день мы не можем изучить в организме изменчивость каждого гена. И даже если прочитан полный геном того или иного вида, то обработка данных – это трудоемкий процесс. Поэтому для описания генетического разнообразия и филогенетических связей достаточно большой выборки необходимо тщательно подбирать маркеры.

При применении того или иного ДНК-маркера в филогенетическом исследовании необходимо учитывать ряд его свойств. Во-первых, необходимо, чтобы используемый маркер был распространен у широкого круга организмов. Это качество позволяет проследить эволюционные процессы внутри таксонов более высокого ранга. Во-вторых, необходимо убедиться, что экспериментальная часть и обработка полученных данных для выбранного маркера достаточно просты, так как слишком громоздкие и нерепрезентативные методы затрудняют использование маркера в разных лабораториях. В-третьих, важно избегать молекул со сложной структурой и убедиться в отсутствии в данном маркере интронов, повторов, мобильных элементов или псевдогенов, поскольку, если все-таки выбранная молекула обладает подобными особенностями, то нужно учитывать их наличие при анализе полученных результатов. Еще одно требование – это отсутствие рекомбинации внутри исследуемого участка. И, наконец, выбранный маркер должен эволюционировать с достаточно высокой скоростью (Avisе et al., 1987). Если маркер соответствует всем вышеперечисленным свойствам, то его также можно использовать и для описания внутривидовых процессов при условии более высокой скорости накопления мутаций.

Для анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей применяют различные ДНК-маркеры. Они могут быть специфическими и выявлять строго определенный участок ДНК или неспецифическими и описывать генетическую изменчивость генома в целом. Рассмотрим некоторые методы, используемые для изучения генетической изменчивости и филогенетических связей эукариот.

Одним из методов, широко используемым для анализа генетической изменчивости видов, является ПЦР-амплификация микросателлитных локусов. Микросателлиты – это тандемные повторы из 2-4 нуклеотидов. Количество повторов может быть десятки и даже сотни. Данные локусы могут достигать 10^5 копий в геноме. Появление мутаций в микросателлитах происходит спонтанно, и накопление различий между аллелями идет гораздо быстрее, чем в функциональных генах. Если мутационный процесс в микросателлитах приводит к появлению большого количества локусов, то данный маркер можно применять для молекулярной идентификации отдельных особей (Wright, Bentzen, 1994). Для анализа изменчивости на уровне популяций обычно используют микросателлитные локусы с небольшим количеством аллелей (Alasaad et al., 2011; Liu et al., 2014; Madesis et al., 2014). Данный подход применяют и в работах по исследованию изменчивости трематод и их хозяев (Campos et al., 2002; Minárik et al., 2014).

Данные, полученные с помощью ПЦР микросателлитных локусов, зачастую комбинируют с другими методами, например, RAPD-анализом (Anou et al., 2002; Gupta et al., 2012). Этот метод, как и предыдущий, позволяет исследовать весь геном в целом. RAPD-анализ представляет собой полимеразную цепную реакцию с использованием коротких праймеров с произвольной нуклеотидной последовательностью. Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза. Данный тип маркеров является доминантным. Наследование локусов происходит согласно законам Менделя. Диагностические возможности RAPD-метода успешно используются в работах, описывающих генетическое разнообразие различных видов животных и растений (Атопкин и др., 2007; Korsunen et al., 2012; Huo et al., 2013; Riad et al., 2013).

Другой пример мультилокусного анализа – метод RFLP (Restriction fragment length polymorphism). В основе данного метода лежит использование рестрикционных эндонуклеаз с последующим анализом полиморфизма длин полученных фрагментов. Данный подход широко применяют в различных генетических работах, в том числе при исследовании изменчивости в популяциях (Ramírez et al., 2012; Bounamous et al., 2014; Hamidinejat et al., 2014).

Кроме использования неспецифических маркеров, генетическую изменчивость и филогенетические отношения исследуют, анализируя нуклеотидные замены в первичной последовательности генов. Для этого применяют специфические праймеры. Одним из примеров специфических маркеров является рибосомная ДНК. Кластеры генов 18S, 5.8S и 28S рРНК образуют группы тандемных повторов в участках ядрышкового организатора хромосом эукариот. Гены разделены двумя транскрибируемыми спейсерами (ITS1 и ITS2). Имеются также внешние транскрибируемые спейсеры (ETS) и нетранскрибируемые межгенные спейсеры (IGS). Скорость накопления мутаций в каждом отдельном регионе рибосомного кластера сильно варьирует: функциональные гены консервативнее, чем спейсерные участки. Данный факт позволяет использовать каждый отдельный участок рДНК для тех или иных целей. Например, для определения межвидовых филогенетических отношений трематод используют гены 18S и 28S рРНК, а также спейсерный участок ITS2 (Olson, Tkach, 2005; Thaenkham et al., 2012; Cutmore et al., 2013). Участок ITS1 рДНК трематод (в том числе представителей семейства Opisthorchiidae) более вариабельный, и его можно использовать для описания внутривидовой изменчивости (Tatonova et al., 2012; Brusentsov et al., 2013).

Помимо генетического материала, содержащегося в ядре, в клетке есть другой источник наследственности – ДНК митохондрий. Все вышеперечисленные свойства, которым должны соответствовать используемые маркеры, характерны и для митохондриальных генов (Awise et al., 1987). Однако митохондриальная ДНК имеет ряд особенностей. Согласно эндосимбиотической теории, митохондрия унаследовала кольцевую ДНК от аэробной бактерии. Поэтому внутри данного

носителя генетической информации записана информация о белках, необходимых для функционирования митохондрии. В процессе эволюции многие гены бактерии-предка оказались ненужными, так как дублировали информацию ядерной ДНК о белках с аналогичными функциями. В результате многие участки митохондриальной ДНК со временем были утеряны (Scheffler, 2007).

Полная длина митохондриального генома билатерально симметричных многоклеточных животных варьирует от 16 000 до 18 000 пар нуклеотидов. В самой митохондрии кодируется 13 белков. Все остальное, что требуется для окислительного фосфорилирования, закодировано в ядерной ДНК. Все 22 транспортные РНК митохондрий закодированы в их собственном геноме и участвуют только в синтезе митохондриальных белков. Они не могут быть использованы для синтеза других белков, потому что существуют различия между ядерным и митохондриальным генетическими кодами. Также мтДНК содержит информацию о двух рибосомных генах (12S и 16S) (Shadel, Clayton, 1997; Voore, 1999). Организация генома трематод является типичной, за одним исключением: у них, также как и в митохондриальных геномах ленточного червя *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, нематод и двустворчатого моллюска *Mytilus* Linnaeus, 1758, отсутствует ген АТФазы 8 (Le et al., 2001).

Основной причиной разнообразия форм жизни является изменчивость в ДНК. Мутации яДНК и мтДНК обычно возникают при репликации. Однако деление митохондрий происходит независимо от деления клетки. В связи с этим мутации в митохондриальной ДНК могут возникать с более высокой частотой, чем в ядерной ДНК. В результате может возникнуть гетероплазмия, когда мтДНК в разных клетках и тканях одного организма отличается. Преимущественно эффект гетероплазмии возникает в tandemных повторах регуляторных областей мтДНК, чаще всего при гибридизации. Различия в последовательностях мтДНК могут быть использованы для описания эволюционных процессов и истории видов (Nesbø et al., 1998; Drosopoulou et al., 2012). Для шистосом также обнаружена изменчивость в tandemных повторах регуляторной области мтДНК (Curtis et al., 2001).

У всех позвоночных животных митохондрии наследуются с цитоплазмой яйцеклетки, поэтому эволюционное древо митохондриальной ДНК соответствует генеалогии по прямой женской линии. При этом мтДНК сильнее подвержена накоплению мутаций в результате генетического дрейфа, а также эффекту генетического бутылочного горлышка (Алтухов, 2003). Кроме того, при изучении беспозвоночных, в частности трематод, необходимо учитывать особенности размножения вида. Большинство трематод – гермафродитные формы с разными типами оплодотворения (самооплодотворение, перекрестное), но есть и раздельнополые виды, например, представители семейства Schistosomatidae Roche, 1907. Данный фактор будет влиять на изменчивость мтДНК.

Еще одной особенностью митохондриальной ДНК является ее неспособность к рекомбинации. Хотя существуют работы, где описаны случаи рекомбинации мтДНК (Eyre-Walker, 2000), на сегодняшний день убедительных доказательств ее существования нет. Вероятно, что большинство обнаруженных случаев рекомбинации митохондриальных геномов являются ошибкой в эксперименте (Piganeau et al., 2004).

Все эти особенности делают мтДНК уникальным средством для таксономической идентификации, филогенетических и филогеографических исследований.

Применение молекулярных методов оправданно и в работах по эволюции и систематике трематод, поскольку систематика с использованием только морфологических признаков может приводить к ошибкам как при определении видов, так и в изучении таксонов более высокого ранга. Например, в 1907 г. Лоосс определял две формы *C. sinensis* как два разных вида (Grove, 1990). Более крупная форма, обозначенная как *C. sinensis*, является обычной для Китая, в то время как более мелкая была обнаружена в Японии и Индокитае и названа *C. endemicus*. Автор также указал в своей работе, что яйца у этих двух форм различаются. Но это утверждение было опровергнуто в 1912 г. Кобаяши, который предположил, что размеры взрослого червя зависят от размера хозяина и интенсивности заражения (Grove, 1990). Поэтому он заключил, что это один вид – *C. sinensis*.

Следует принимать во внимание и длительность заражения хозяина на момент извлечения паразита. Если марту извлечь раньше срока достижения зрелости, то у нее могут оказаться недоразвитыми выделительная и половая системы органов, что повлияет на определение вида. Если же хозяин заражен длительно, в органах паразита начинают происходить дегенеративные изменения, что тоже может стать причиной ошибочной идентификации вида (Komiyu, Suzuki, 1964). Во многих семействах трематод сложно дифференцировать отдельные роды и виды. В результате эти таксоны не имеют четких морфологических границ (Olson, Tkach, 2005).

Поэтому методы молекулярного генотипирования трематод используются все чаще. При этом необходимо понимать особенности наследования и изменчивости каждого маркера. То есть необходимо тщательно подбирать молекулярные маркеры для каждого отдельного случая и поставленной задачи.

1.3. Исследование генетической изменчивости и филогенетических связей

C. sinensis

Несмотря на высокую эпидемиологическую значимость китайской печеночной двуустки, генетическое разнообразие и филогенетические связи этого вида изучены недостаточно.

Для описания внутривидового генетического разнообразия *C. sinensis* в основном используют частичные и полные последовательности участков рибосомного кластера (18S, ITS1, ITS2) ядерной ДНК, а также частичную последовательность гена *cox1* митохондриальной ДНК (Катохин и др., 2008; Park, Yong, 2001; Lee, Huh, 2004, Liu et al., 2007; Park, 2007; Kang et al., 2008; Tatonova et al., 2013; Xiao et al., 2013). Полная последовательность участка ITS1-5.8S-ITS2 была проанализирована только в одном исследовании (Tatonova et al., 2012).

На сегодняшний день имеется небольшое количество исследований популяционной структуры и филогеографии китайской печеночной двуустки. В данных работах обычно используют небольшие выборки из нескольких стран и решаются частные задачи. Например, Парк и Йонг в своей работе (Park, Yong,

2001) выявили высокий уровень гомологии анализируемых нуклеотидных последовательностей для образцов *C. sinensis* из Китая и Кореи на основе анализа последовательностей гена 18S и спейсера ITS2 рДНК и гена *cox1*. Однако уже через 3 года Ли и Хух (Lee, Huh, 2004) сообщают об обнаружении небольшой внутривидовой изменчивости для представителей китайской печеночной двуустки из тех же стран. В работе этих авторов, помимо вышеперечисленных маркеров, были использованы нуклеотидные последовательности участка ITS1 рибосомного кластера. Парк (Park, 2007) подтверждает наличие изменчивости для данных генетических маркеров.

Канг с соавторами (Kang et al., 2008) расширили исследуемую выборку до 22 образцов и обнаружили 7 генотипов для *C. sinensis* из Китая и Кореи по данным секвенирования полной нуклеотидной последовательности ITS1. В этот же период были получены нуклеотидные последовательности участка ITS2 и гена *cox1* для *C. sinensis* из России и Японии (Катохин и др., 2008). Проведенный в данном исследовании анализ внутривидового генетического полиморфизма для образцов китайской печеночной двуустки из России, Японии, Китая и Кореи показал отсутствие изменчивости для рибосомного маркера ядерной ДНК и очень низкий уровень изменчивости (0.3%) для митохондриального маркера.

Сяо с соавторами (Xiao et al., 2013) применили ITS1 в качестве молекулярного маркера для описания генетической изменчивости китайской печеночной двуустки из различных провинций Китая (по 7 образцов из каждого локалитета). При этом в каждом локалитете паразит был выделен из разных видов дефинитивных хозяев (кошки, собаки, человека или кролика). Филогенетическое дерево, сконструированное в данном исследовании, образовало кластеры, которые хорошо разделили популяции отдельных локалитетов. Хотя, вероятнее всего, что данный тип изменчивости – это не результат действия пространственной изоляции между провинциями, а адаптация паразита к дефинитивному хозяину. Данный вывод можно сделать на основании того, что южные и северные провинции формируют общие кластеры (Гуандун и Хэйлунцзян; Гуанси и Хэйлунцзян). При этом нуклеотидные последовательности ITS1 человека и

кролика были получены из двух различных локалитетов одной провинции (Хэйлунцзян), однако находятся в разных кластерах полученного дерева, что также говорит об адаптации паразита к дефинитивному хозяину.

Помимо анализа внутривидового полиморфизма китайской печеночной двуустки из разных стран была сделана попытка описать генетическую изменчивость вида из разных временных отрезков (Liu et al., 2007). Для этого авторы использовали участки ITS1 и ITS2 рибосомного кластера яДНК для яиц, полученных из фекалий пациента в наши дни и выделенных из останков, датированных 167 годом до нашей эры. Участок ITS2 для обеих выборок оказался идентичным. Между последовательностями ITS1 из современного и древнего образцов было обнаружено 15 нуклеотидных замен. Однако это значение сравнимо с данными по количеству отличий между образцами из разных стран (Lee, Nuh, 2004), а также для популяций внутри одной страны (Xiao et al., 2013). Поэтому нельзя утверждать, что данный вариант изменчивости является результатом отбора в течение двух тысяч лет.

В последнее время для исследований внутривидового генетического разнообразия *C. sinensis* все чаще используют мультилокусный анализ (Kang et al., 2008; Lai et al., 2008; Liu et al., 2012; Sun et al., 2013; Xiao et al., 2013). Данный подход подразумевает использование сразу нескольких последовательностей, на основании которых строят общее дерево, отражающее внутривидовые филогенетические отношения.

Лиу с соавторами (Liu et al., 2012) использовали частичные последовательности 4 кодирующих генов митохондриальной ДНК (*cox1*, *cox2*, *nad1* и *nad2*) для описания генетической изменчивости китайской печеночной двуустки из разных географических регионов Китая. Общая длина комбинированной последовательности составила 1764 пн. Данное исследование не выявило географической подразделенности между китайскими популяциями. Также не обнаружено связи с паразитированием в определенном дефинитивном хозяине (кошке или собаке). Тем не менее, такой маркер позволил построить

дерево, соответствующее филогенетическим взаимоотношениям *C. sinensis* с другими представителями трематод.

Использование комбинированной последовательности из двух других митохондриальных маркеров (*nad1*, *nad2*) общей длиной 1437 пн выявило внутривидовую изменчивость (Xiao et al., 2013), связанную с дефинитивными хозяевами. Примечательно, что нуклеотидные последовательности, выделенные из паразитов животных (кролика, собаки и кошки) в ходе данного эксперимента, а также последовательности из России, Китая и Кореи, полученные из генного банка (хозяева: сирийский хомячок и кошка), оказались генетически более близкими друг к другу, чем образцы, полученные из человека. Последние сформировали отдельный узел с высокой бутстреп-поддержкой. Таким образом, применение мультилокусного подхода в данном случае позволило выявить особенности генетической изменчивости *C. sinensis*, имеющие, вероятно, адаптивное значение в формировании отношений паразит-хозяин.

Сун с соавторами (Sun et al., 2013) расширили набор маркеров, используемых для мультилокусного анализа, а также количество исследуемых образцов. Для этого они создали комбинированную последовательность из 4 нуклеотидных последовательностей яДНК (некодирующего участка ITS1 и генов белков актина (*act*), β -тубулина (*tub*) и фактора элонгации (*ef-1a*)) и 4 нуклеотидных кодирующих последовательностей мтДНК (генов *cox1*, *cox3*, *nad4* и *nad5*). Общая длина последовательностей составила 4896 пн. Анализ комбинированных последовательностей не выявил внутривидовую подразделенность, связанную с географическим расположением выборок. Также не было обнаружено связи между паразитом и его хозяином. Это могло быть результатом того, что авторы использовали в анализе не только мариты, но также метацеркарии, паразитирующие у второго промежуточного хозяина. Помимо мультилокусного подхода, в данной работе была построена гаплотипическая сеть для *C. sinensis* по данным секвенирования участка ITS1. Данный вид анализа продемонстрировал, что экспансия *C. sinensis*, вероятнее всего, произошла из центрального Китая. Следует принимать во внимание, что скорость эволюции

митохондриальной и ядерной ДНК для разных животных сильно отличается (Vawter, Brown, 1986). Так, например, в работе Суна и его коллег (Sun et al., 2013) нуклеотидная изменчивость митохондриальных генов в среднем в 3 раза выше, чем изменчивость ядерных маркеров. Этот факт не учитывался при анализе комбинированной нуклеотидной последовательности. Поэтому использование такого маркера, с одной стороны, оказалось полезным для выявления внутривидовых филогенетических взаимоотношений, но, с другой стороны, при оценке эволюционных процессов внутри вида исследователи не учитывали различные типы наследования, а также скорость накопления мутаций для ядерной и митохондриальной ДНК.

Еще одним вариантом мультилокусного анализа является применение неспецифических праймеров, например, произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD). С помощью этого метода была описана внутривидовая изменчивость представителей *C. sinensis* из двух провинций Китая (Lai et al., 2008). Используемые в данной работе RAPD-фрагменты выявили низкие, но достоверные различия между выборками из северного и южного Китая. Не исключено, что между представителями китайской печеночной двуустки из разных стран возможно обнаружение фиксированных отличий. Также Лай с соавторами (Lai et al., 2008) использовали анализ полиморфизма мобильных генетических элементов, а именно: ретротранспозона *CsRn1* с длинными концевыми повторами (последовательностями ДНК, повторенными сотни или тысячи раз). Данный метод позволил выявить, что китайская печеночная двуустка в южной провинции Китая эволюционирует быстрее трематод из северной провинции. Авторы полагают, что большое накопление мутаций в последовательностях *CsRn1* для *C. sinensis* из Гуандуна по сравнению с образцами из северного локалитета опосредовано сразу несколькими факторами. С одной стороны, температура и влажность южной провинции способствует ускорению смены поколений паразита, а, значит, и накоплению большего количества мутаций. С другой – пищевые привычки населения (использование в пищу сырой рыбы), а также несоблюдение элементарных условий гигиены (расположение

туалетов рядом с прудами и системами аквакультуры) приводят к замыканию жизненного цикла паразита.

Для изучения генетического разнообразия *C. sinensis* используют и другие методы. Так, например, для выявления различий между образцами китайской печеночной двуустки из Китая и Кореи Парк и Йонг применили аллозимный анализ (Park, Yong, 2001). В данной работе изменчивость одного из восьми используемых ферментов (α -глицерофосфатдегидрогеназы) оказалась специфичной для популяций из Китая и Кореи. Таким образом, существует возможность применять данный изофермент для описания внутривидовых филогенетических процессов *C. sinensis*. Однако повторные эксперименты не были проведены. Не исключено, что данный вид изменчивости опосредован действием иммунной системы хозяина (кроликов) на энергетический обмен паразита. Еще один метод для изучения географической изменчивости *C. sinensis*, который применили в той же работе, – это описание морфологических особенностей хромосом паразитов. Кариотипы *C. sinensis* из Китая и Кореи отличались по соотношению различных типов хромосом. Кариотип китайских популяций состоял из 2 метацентрических, двух мета-/субметацентрических, 16 субметацентрических и 8 субтелоцентрических пар хромосом, тогда как хромосомный набор для популяции из Кореи представлен 3 метацентрическими, 1 мета-/субметацентрической, 16 субметацентрическими и 8 субтелоцентрическими парами хромосом. Авторы сделали вывод, что данные о хромосомах паразита могут быть использованы для изучения генома китайской печеночной двуустки.

Интерес к изучению филогенетических взаимоотношений *C. sinensis* на основе генетических признаков вызван эпидемиологическим и сельскохозяйственным значением паразита. Исследования на основе молекулярных маркеров выявляют связи между отдельными группами паразитических червей и дают ключ к пониманию процессов формирования определенных филогенетических групп.

В основном для реконструкции эволюционной истории генов используют различные участки рибосомного кластера ядерной ДНК (Катохин и др., 2008; Lee

et al., 2007; Park, 2007; Kang et al., 2008; Thaenkhram et al., 2012). Ли с соавторами (Lee et al., 2007) использовали небольшой участок гена 28S рРНК, который ранее применялся для определения филогенетических связей других дигенетических сосальщиков (Olson et al., 2003). В результате китайская печеночная двуустка сформировала общий кластер с *Plagiorchis muris* Tanabe, 1922, представителем Plagiorchiidae Luhe, 1901, весьма далекого семейства трематод. В целом, полученное дерево не отражало филогенетических отношений между трематодами, построенных на основе морфологических признаков. Скорее всего, такая картина получилась в результате того, что в анализе был использован короткий фрагмент нуклеотидной последовательности (278-313 пн). В этом же году Парк (Park, 2007) изучал филогенетические отношения плоских червей с привлечением нуклеотидных последовательностей генов 18S (1077 пн) и 28S (299 пн) рДНК, также участка ITS2 (502 пн) рибосомного кластера яДНК. При этом деревья, смоделированные на основе последовательностей первых двух маркеров больше соответствовали классической систематике трематод (Bray et al., 2008), в то время, как короткий участок гена 28S (299 пн) рРНК оказался непригоден для формирования достоверных филогенетических связей. Так, например, представители близких семейств Opisthorchiidae и Heterophyidae Odhner, 1914 образовали общий кластер с эволюционно далеким видом фасциол, тогда как род *Metagonimus* Katsurada, 1912 кластеризовался с другими семействами. Применение более короткого фрагмента участка ITS2 для описания отношений представителей семейства Opisthorchiidae позволило сконструировать статистически подтвержденное дерево (Катохин и др., 2008). Данная филогенетическая реконструкция показала, что *Opisthorchis felinus* Rivolta, 1884 гораздо ближе к *O. sinensis*, чем к другому представителю описторхид – *O. viverrini* Poirier, 1886. Однако применение некодирующего участка ITS1 (Kang et al., 2008) не подтвердило данное предположение: согласно этому исследованию различия между описторхидами гораздо меньше, чем между родами *Opisthorchis* и *Clonorchis*. Тэнкхам с соавторами расширили анализируемую группу до надсемейства Opisthorchioidea (Thaenkhram et al., 2012). Эти исследователи

выявили, что при использовании последовательностей гена 18S рДНК для изучения филогенетических отношений внутри надсемейства, часть представителей семейства Heterophyidae кластеризуется с представителями семейства Opisthorchiidae (в том числе с *C. sinensis*). Авторы предложили пересмотреть систематику данных филогенетических групп с привлечением различных морфологических и молекулярных подходов.

Большинство исследователей помимо ядерных маркеров используют для филогенетического анализа митохондриальные гены. Для изучения филогенетических отношений китайской печеночной двуустки чаще всего применяют частичную последовательность митохондриального гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (Катохин и др., 2008; Lee et al., 2007; Park, 2007; Saijuntha et al., 2008). Данный маркер позволяет построить филогенетические деревья, которые отражают отношения между близкими таксонами, описанными на основе морфологических признаков. Однако результаты анализа могут отличаться от данных по ядерным маркерам из-за разных типов наследования ДНК (Катохин и др., 2008).

Помимо нуклеотидных последовательностей, для анализа филогении и эволюции паразитов можно использовать первичные последовательности белков. Так для описания филогенетических отношений *C. sinensis* были применены аминокислотные последовательности катепсина F (цистеиновой протеазы). Эволюция данного белка отражает филогению организма, в котором он синтезируется, и позволяет построить консенсусное дерево, включающее представителей различных таксонов (Kang et al., 2004). Еще одним примером использования аминокислотных последовательностей в филогенетических исследованиях является работа группы исследователей под руководством Кима (Kim et al., 2007). Данная работа включает в себя анализ филогенетических отношений различных таксонов на основе белковой последовательности фактора элонгации-1 α . Авторы использовали филогенетически далекие группы организмов, из которых *C. sinensis* образовал общий кластер с представителем рода *Schistosoma* Weinland, 1858.

Возвращаясь к вопросу о применении мультилокусного анализа, стоит также упомянуть некоторые работы, посвященные межвидовым филогенетическим отношениям *C. sinensis*. Например, группа исследователей новосибирского Института цитологии и генетики разработала комбинированный ядерный маркер Pm-int9, включающий в себя девятый интрон гена парамиозина с фланкирующими экзонными последовательностями (Shekhovtsov et al., 2009). Филогенетический анализ на основе комбинированного маркера позволил получить новые данные о межвидовых отношениях между *C. sinensis* и двумя представителями рода *Opisthorchis*. Согласно полученным данным, сестринский вид *O. viverrini* генетически ближе к китайской печеночной двуустке, чем *Opisthorchis felineus*, то есть данное исследование согласуется с выводами, сделанными на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка ITS2 (Катохин и др., 2008). Использование более масштабного исследования с привлечением 32 рибосомных белков также подтвердило вышеуказанное заключение (Pomaznou et al., 2013). Полученные результаты позволили сделать предположение о вероятной ошибке в построении филогенетических отношений дигенетических сосальщиков на основе молекулярных признаков, ранее выполненном Олсоном и Ткачем (Olson, Tkach, 2005). Ван с коллегами (Wang et al., 2011) для построения филогенетического дерева применили 44 аминокислотные последовательности белков, отвечающих за различные функции. Консенсусное дерево включало 9 представителей различных таксонов, в том числе *C. sinensis* и два вида шистосом. Топология дерева и ранее полученные данные говорят о том, что указанные виды эволюционируют с приблизительно одинаковой скоростью.

Кроме генов ядерной ДНК для построения филогенетических отношений *C. sinensis* и других паразитических червей исследователи в последние годы используют 12 аминокислотных последовательностей белков, закодированных в геноме митохондриальной ДНК (Cai et al., 2012; Lee et al., 2013; Yan et al., 2013). Самое масштабное исследование эволюционных процессов в различных таксонах с использованием различных генов произведено Ханом с коллегами (Hahn et al.,

2014): была сконструирована суперматрица для 10 видов из различных типов животных, содержащая 312 аминокислотных последовательностей. Китайская печеночная двуустка образовала общий кластер с другими трематодами (*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 и *S. japonicum* Katsurada, 1904), а также цестодами и представителями моногеней, что подтверждает гипотезу о монофилетическом происхождении группы Neodermata Ehlers, 1985. Таким образом, мультилокусный подход позволяет анализировать таксоны более высокого ранга, учитывая при этом взаимоотношения внутри каждого отдельного таксона.

Помимо описания филогенетических отношений между отдельными таксонами и микроэволюционных процессов внутри вида, исследователи анализируют эволюцию отдельных молекул внутри организма. Например, для этой цели можно использовать нуклеотидные последовательности длинных концевых повторов ретротранспозонов (Bae, Kong, 2003). Концевые повторы *CsRn1*, полученные для *C. sinensis*, формируют 4 различные линии, которые имеют разное время интеграции в ядерную ДНК паразита. Если рассматривать индивидуальные геномы в популяции, самыми гетерогенными являются ретротранспозоны, недавно включившиеся в ДНК хозяина. Вероятно, данные молекулы оказывают влияние на экспрессию генов, которые находятся вблизи этих мобильных генетических элементов. Анализ изменчивости ретротранспозонов, а также выяснение места их расположения в геноме китайской печеночной двуустки могут быть полезными для сравнительных геномных исследований популяций паразита из различных эндемичных регионов.

Эволюционные процессы на молекулярном уровне для *C. sinensis* описаны и в других работах. Cho с соавторами (Cho et al., 2006) обнаружили для китайской печеночной двуустки 3 формы альдолазы ФДФ (фруктоза-1,6-дифосфат), которые локализируются в различных органах паразита. Данные изоформы при построении филогенетического дерева образовали общие кластеры с другими плоскими червями *Echinococcus multilocularis* и *Schistosoma mansoni*. Также в данный кластер попала аминокислотная последовательность альдолазы *Drosophila*

melanogaster Meigen, 1830. При этом последовательности круглых червей (*Onchocerca volvulus* Bickel, 1982 и *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900) сформировали отдельный кластер. Примечательно, что все изоформы альдозазы *C. sinensis* сходны с ФДФ-альдозазой А человека, которая участвует в образовании энергии в мышечной ткани. Поскольку изоформы фермента были получены для *C. sinensis*, выделенного из кролика, существует вероятность, что синтез данных ферментов в организме паразита связан с его адаптацией к дефинитивному хозяину. Также не исключено, что на личиночной стадии в китайской печеночной двуустке можно обнаружить другие разновидности альдозаз. Подобные исследования позволяют лучше понимать биологию *C. sinensis* и его паразито-хозяинные отношения.

Аналогичный пример белковой изменчивости для китайской печеночной двуустки был обнаружен другими исследователями для β -тубулина (Li et al., 2009). В данной работе были проанализированы 2 изоформы белка, которые имели большое сходство с аминокислотными последовательностями других трематод. Общий с шистосомами и фасциолой кластер имел гораздо большее филогенетическое сходство с представителями позвоночных (человек, лягушка, крыса, мышь), чем с нематодами.

Работу Сюй с соавторами (Xu et al., 2010), посвященную характеристике различных типов микро-РНК *C. sinensis*, также можно отнести к исследованиям эволюции молекул внутри вида. Помимо общих свойств, выявленных для всех ранее исследованных организмов, обнаружены отличия в количестве копий нуклеотидных последовательностей консервативных семейств микро-РНК, отклонение в нуклеотидном составе в отдельных позициях, а также 6 новых видов микро-РНК, уникальных для китайской печеночной двуустки. Авторы полагают, что выявленные особенности являются адаптацией паразита к условиям существования в беспозвоночных и позвоночных хозяевах.

Таким образом, для изучения генетической изменчивости и филогенетических связей *C. sinensis* используются различные методы и подходы, которые позволяют решить поставленные перед исследователями задачи.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение паразитологического материала

Паразитологический материал из России любезно предоставлен Беспрозванных В.В., из Вьетнама – PhD Хуном Н.М. Образцы *Clonorchis sinensis* были получены из 5 локалитетов России и Вьетнама: три точки сбора в Приморском крае России (с. Кронштадтка, с. Кондратеновка, оз. Магдыковое) и образцы из двух провинций Вьетнама (Тхайбинь и Дананг) (табл. 1; рис. 1).

Таблица 1

Список использованных в работе образцов *C. sinensis*

№	Место и год отлова	Промежуточный / дефинитивный хозяин	Кол-во образцов
1	Россия, Приморский край, Дальнереченский район, оз. Магдыковое, 2011 г.	Озерный маньчжурский гольян <i>Phoxinus phoxinus mantschuricus</i> / крыса*	13
2	Россия, Приморский край, Спасский район, с. Кронштадтка, 2010 г.	Амурский чебачок <i>Pseudorasbora</i> <i>parva</i> / крыса*	13
3	Россия, Приморский край, Уссурийский городской округ, с. Кондратеновка, р. Комаровка, 2010 г.	Пескарь-губач Черского <i>Sarcocheilichthys czerskii</i> Berg, 1914 / крыса*	13
4	Вьетнам, провинция Тхайбинь, 2012 г.	Кошка*	13
5	Вьетнам, провинция Дананг, 2012 г.	Кошка*	13

* - дефинитивный хозяин.

Мышечную ткань рыб семейства Cyprinidae, выловленных в российских локалитетах, проверяли на зараженность метацеркариями и скармливали крысам. Через три недели после инфицирования крыс обследовали на наличие взрослых червей в печени. Мариты из вьетнамских провинций выделены из печени кошек, инфицированных естественным путем. Образцы, полученные из кошек, были в 2-3 раза крупнее выращенных в лабораторных крысах (1.5-1.6 и 0.5-0.7 см соответственно). Извлеченные экземпляры паразита отмывали несколько раз в физиологическом растворе и фиксировали в 96% спирте. Образцы хранили при

температуре +4 °С. Вид идентифицирован по морфометрическим характеристикам (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Все экспериментальные работы с животными осуществляли в соответствии с Правилами по использованию в опытах позвоночных животных, утвержденными Президиумом РАН.

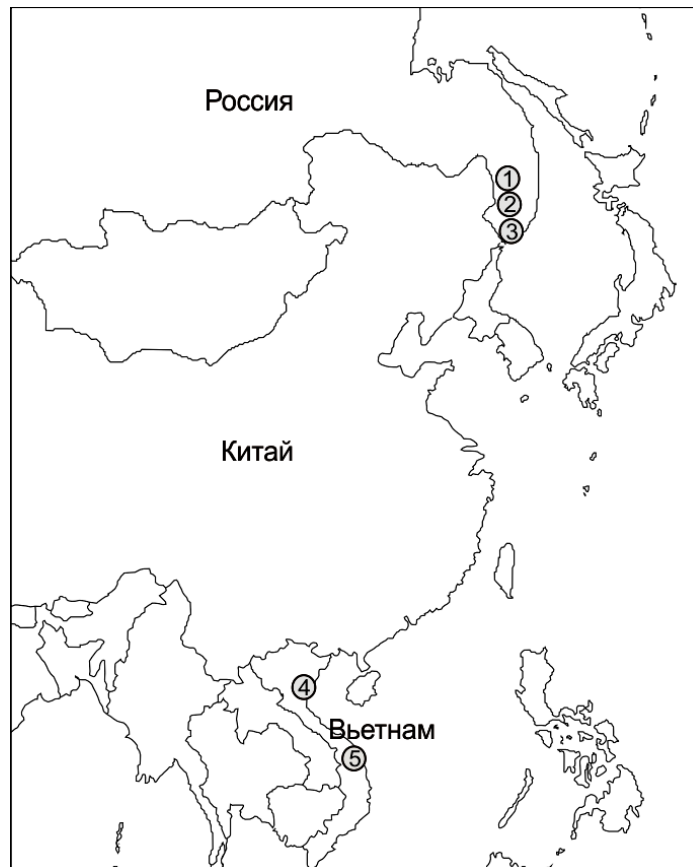


Рис. 1. Места сбора образцов *C. sinensis*: 1 – оз. Магдыковое, Дальнереченский район, Приморский край, Россия; 2 – с. Кронштадтка, Спасский район, Приморский край, Россия; 3 – с. Кондратеновка, Уссурийский городской округ, Приморский край, Россия; 4 – провинция Тхайбинь, Вьетнам; 5 – провинция Дананг, Вьетнам

2.2. Получение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК использовали метод HotSHOT (Truett et al., 2000). Несомненными преимуществами данного метода являются его простота и возможность длительного хранения ДНК. Перед выделением ДНК каждый

образец или его часть (2-3 мм³ в случае большого размера) помещали в отдельную пробирку, затем сушили при температуре 50 °С в течение 15-30 мин для удаления спирта. После этого в пробирку добавляли 76 мкл раствора для щелочного лизиса (25 мМ NaOH, 0.2 мМ ЭДТА, рН = 12) и нагревали его до 95 °С в течение 30 мин. Затем охлаждали до 10 °С в течение 10 мин и добавляли 76 мкл второго раствора – нейтрализующего буфера (40 мМ Трис-HCl, рН = 5). Полученный раствор ДНК хранили при -20 °С.

2.3. Амплификация отдельных последовательностей ДНК

В работе были использованы полноразмерный участок ITS1-5.8S-ITS2 ядерной рибосомной ДНК и полная последовательность митохондриального гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы, *cox1*. Для амплификации ITS1-5.8S-ITS2 рДНК использовали следующие универсальные праймеры: прямой BD1 (5'-GTC-GTA-ACA-AGG-TTT-CCG-TA-3') и обратный BD2 (5'-TAT-GCT-TAA-G(A)T-TCA-GCG-GGT-3') (Morgan, Blair, 1995). Реакционная смесь составила 20 мкл и содержала 5 пкМ каждого праймера, реакционный буфер, 0.8 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), 2.0 мМ MgCl₂ и 0.5 е.а. Taq ДНК полимеразы (Thermo Scientific, Литва) и 4 мкл ДНК. ПЦР-реакцию проводили в амплификаторе GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, США) при следующих условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 94 °С, затем 35 циклов: денатурация (15 сек при 94 °С), отжиг праймера (30 сек при 55 °С), синтез (2 мин при 72 °С). Завершался процесс дополнительным синтезом в течение 5 мин при 72 °С и охлаждением до 4 °С.

Митохондриальный ген *cox1* амплифицировали с использованием следующих праймеров: прямого 5cF22 (5'-TAG-ACT-ATC-TGT-CTT-CAA-AAC-A-3'), сконструированного в программе Lasergene PrimerSelect (Chelomina et al., 2014), и обратного CO1-Rv (5'-AAC-AAA-TCA-TGA-TGC-AAA-AGG-TA-3'; Катохин и др., 2008). Реакционная смесь составила 20 мкл и состояла из вышеперечисленных компонентов. Количество ДНК увеличили до 6 мкл.

Программа для ПЦР следующая: предварительная денатурация – 1 мин при 95 °С, затем 35 циклов: денатурация (30 сек при 94 °С), отжиг праймера (1 мин при 52 °С), синтез (2 мин при 72 °С). Завершался процесс дополнительным синтезом в течение 7 мин при 72 °С и охлаждением до 4 °С.

При каждой постановке амплификации использовали отрицательный контроль (реакционную смесь без добавления ДНК).

2.4. Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных участков ДНК

Реакционная смесь для секвенирования (10 мкл) содержала 30 нг ПЦР-продукта, 5 пкМ праймера и 1 мкл BigDye Terminator v.3.1. Список праймеров, использованных для секвенирования полноразмерного участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК и полной последовательности гена *cox1* мтДНК представлен в таблице 2.

Таблица 2

Список праймеров для секвенирования

Участок ДНК	Праймер	Последовательность 5'→3'	Ориентация	Ссылка
ITS1-5.8S-ITS2	BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA	Прямой	Morgan, Blair, 1995
	3S	GGTACCGGTGGATCACGTGGCTAGTG	Прямой	Morgan, Blair, 1995
	BD2	TATGCTTAAG(A)TTCAGCGGGT	Обратный	Morgan, Blair, 1995
	R1i15	CCATTCTGACAGCACATCCCGT	Обратный	Tatonova et al., 2012
ген <i>cox1</i>	5cF22	TAGACTATCTGTCTTCAAACA	Прямой	Chelomina et al., 2014
	CO1'3-Rv	TGTTAATATTGCCGGGGTTT	Прямой	Катохин и др., 2008
	5cFS16	ATAGGCGGGTGAGGGAACGACA	Прямой	Chelomina et al., 2014
	CO1-Rv	AACAATCATGATGCAAAAGGTA	Обратный	Катохин и др., 2008
	5cR4	GATCTCATAGACGCTCCCGAGT	Обратный	Chelomina et al., 2014
	5cRS5	TGTCGTTCCCTCACCCGCCTAT	Обратный	Chelomina et al., 2014

Условия ПЦР-реакции для обоих маркеров были идентичными: предварительная денатурация в течение 1 мин при 96 °С, затем 30 циклов: денатурация (30 сек при 96 °С), отжиг праймера (30 сек при 55 °С), синтез (4 мин при 60 °С). Далее ПЦР-продукт охлаждался до 4 °С.

Очистка продукта проводилась следующим образом:

1. В пробирки добавляли 1 мкл 3М ацетата Na и 10 мкл изопропанола и помещали в холодильник (-20 °С) на 40 мин.
2. Центрифугировали при 13 200 об./мин в течение 20 мин. Супернатант сливали.
3. Проводили 2 отмывки 96% спиртом: добавляли 60 мкл спирта, перемешивали и центрифугировали в течение 20 мин при скорости 13 200 об./мин. Супернатант сливали.
4. Осадок сушили при 60 °С в течение 40 мин.

Перед секвенированием к сухому остатку добавляли 12 мкл формамида Hi-Di™. Затем денатурировали ДНК при 95 °С в течение 3 мин с последующим охлаждением до 4 °С. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3130 Applied Biosystems на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН (капилляры длиной 50 см; полимер POP-7).

Полученные нуклеотидные последовательности визуально проверяли с помощью программы Finch TV ver. 1.4.0 и выравнивали вручную в программе MEGA ver. 5.03. Нуклеотидные последовательности исследуемого вида с помощью опции BLAST сравнивали с другими последовательностями в геномной базе данных NCBI. Для анализа были использованы аналогичные последовательности для *C. sinensis* из других регионов (Китай, Корея, Вьетнам, Япония) (табл. 3).

2.5. Клонирование фрагмента ITS1 ядерной рДНК

При прямом секвенировании для части образцов в хроматограммах обнаружены двойные пики, в частности, T/C в позиции 114 пн. Поэтому для подтверждения результатов прямого секвенирования использовали молекулярное

Нуклеотидные последовательности *C. sinensis*, использованные для анализа внутривидовой изменчивости

Регион	Нуклеотидная послед-ть	Длина, пн	<i>n</i>	Номер в геномном банке	Ссылка
Магдыковое (Россия)	ITS1-5.8S-ITS2	1116/1121	13	Отсутствует	Настоящее исследование
Кронштадтка (Россия)	ITS1-5.8S-ITS2	1116	13	JQ048576- JQ048588	Tatonova et al., 2012
Кондратеновка (Россия)	ITS1-5.8S-ITS2	1116/1121	13	JQ048589- JQ048601	Tatonova et al., 2012
Тхайбинь (Вьетнам)	ITS1-5.8S-ITS2	1116/1121	13	Отсутствует	Настоящее исследование
Дананг (Вьетнам)	ITS1-5.8S-ITS2	1116/1121	13	Отсутствует	Настоящее исследование
Гуаньси (южный Китай)	ITS1	657	1	AF181892	Lee, Huh, 2004
Шэньян, Шуанчэн, Чанчунь, Гундзян, Тайлай, Суйхуа, Хайлунь, Дацин, Бинсян (северный Китай)	ITS1	657/662	17	AF192414; EU038112- EU038119; HQ186253- HQ186260	Lee, Huh, 2004; Kang et al., 2008; не опубликовано
Кимхэ, Куре, Чинджу (Корея)	ITS1	657/662	15	AF181891; EU038120- EU038133	Lee, Huh, 2004; Kang et al., 2008
Гуанчжоу (провинция Гуандун), Наньнин (южный Китай)	ITS1	643	14	KC170164- KC170177	Xiao et al., 2013
Дацин, Цзямусы (северный Китай)	ITS1	643	14	KC170178- KC170191	Xiao et al., 2013
Хабаровский край, р. Амур (Россия)	ITS1	451/456	13	KC987527- KC987539	Брусенцов и др., 2013
Приморский край, Дальнереченский район, р. Большая Уссурка (Россия)	ITS1	451/456	5	KC987514- KC987518	Брусенцов и др., 2013
Приморский край, Анучинский район, р. Арсеньевка (Россия)	ITS1	451/456	8	KC987519- KC987526	Брусенцов и др., 2013
Цзянсу, Аньхой, Чжэцзян, Гуаньси, Гуандун (южный Китай)	ITS1	451/456	37	HQ874530, HQ874558, HQ874559, HQ874566, HQ874569,	Sun et al., 2011

Продолжение таблицы 3

Регион	Нуклеотидная послед-ть	Длина, пн	<i>n</i>	Номер в геном банке	Ссылка
Цзянсу, Аньхой, Чжэцзян, Гуаньси, Гуандун (южный Китай)	ITS1	451/456	37	HQ874583, HQ874604; HQ874523, HQ874537, HQ874538, HQ874584- HQ874586, HQ874588, HQ874599; HQ874531, HQ874562, HQ874567, HQ874568, HQ874594, HQ874600; HQ874525, HQ874529, HQ874533, HQ874536, HQ874542, HQ874543, HQ874579, HQ874580; HQ874532, HQ874535, HQ874540, HQ874541, HQ874581, HQ874582, HQ874587, HQ874602	Sun et al., 2011
Хэнань, Хунань, Хубэй, Цзянси (центральный Китай)	ITS1	451/456	31	HQ874550, HQ874571- HQ874573, HQ874589, HQ874595, HQ874597, HQ874601; HQ874534, HQ874551- HQ874554, HQ874590, HQ874591, HQ874598; HQ874524, HQ874539, HQ874544- HQ874547,	Sun et al., 2011

Продолжение таблицы 3

Регион	Нуклеотидная послед-ть	Длина, пн	<i>n</i>	Номер в геномном банке	Ссылка
Хэнань, Хунань, Хубэй, Цзянси (центральный Китай)	ITS1	451/456	31	HQ874578, HQ874592, HQ874593; HQ874560, HQ874561, HQ874563- HQ874565, HQ874596	Sun et al., 2011
Цзилинь, Хэйлуцзян (северный Китай)	ITS1	451/456	14	HQ874527, HQ874528, HQ874555- HQ874557, HQ874570; HQ874526, HQ874548, HQ874549, HQ874574- HQ874577, HQ874603	Sun et al., 2011
Чхильгок (Корея)	ITS1	451/456	2	JN034594, JN034595	Liu et al., 2007
Кимхэ (Корея)	5.8S	146	1	AF217094	Lee, Huh, 2004
Гуаньси (южный Китай)	5.8S	146	1	AF217097	Lee, Huh, 2004
Шэньян (северный Китай)	5.8S	146	1	AF217099	Lee, Huh, 2004
Кимхэ (Корея)	ITS2	300	1	AF217094	Lee, Huh, 2004
Гуаньси (южный Китай)	ITS2	300	1	AF217097	Lee, Huh, 2004
Шэньян (северный Китай)	ITS2	300	1	AF217099	Lee, Huh, 2004
Магдыковое (Россия)	ген <i>cox1</i>	1560	13	KJ204560- KJ204572	Chelomina et al., 2014
Кронштадтка (Россия)	ген <i>cox1</i>	1560	13	KJ204573- KJ204585	Chelomina et al., 2014
Кондратеновка (Россия)	ген <i>cox1</i>	1560	13	KJ204586- KJ204598	Chelomina et al., 2014
Тхайбинь (Вьетнам)	ген <i>cox1</i>	1560	13	KJ204599- KJ204611	Chelomina et al., 2014
Дананг (Вьетнам)	ген <i>cox1</i>	1560	13	KJ204612- KJ204624	Chelomina et al., 2014
Хабаровск (Россия)	ген <i>cox1</i>	1560	1	FJ381664	Shekhovtsov et al., 2010

Окончание таблицы 3

Регион	Нуклеотидная послед-ть	Длина, пн	<i>n</i>	Номер в геномном банке	Ссылка
Гуандун (Китай)	ген <i>cox1</i>	1560	1	JF729303	Cai et al., 2012
Корея	ген <i>cox1</i>	1560	1	JF729304	Cai et al., 2012
Хабаровск (Россия)	ген <i>cox1</i>	324	1	EF688129	Катохин и др., 2008
Нгеан, Тханьхоа (Вьетнам)	ген <i>cox1</i>	444	1	EU652407, EU652408	Не опубликовано
Хэйлуцзян (Китай)	ген <i>cox1</i>	381	3	FJ965379-FJ965381	Liu et al., 2012
Хунань (Китай)	ген <i>cox1</i>	381	2	FJ965382, FJ965383	Liu et al., 2012
Гуандун (Китай)	ген <i>cox1</i>	381	10	FJ965384-FJ965393	Liu et al., 2012
Гуаньси (Китай)	ген <i>cox1</i>	381	3	FJ965376-FJ965378	Liu et al., 2012
Окаяма (Япония)	ген <i>cox1</i>	324	1	EF688130	Катохин и др., 2008
Кимхэ (Корея)	ген <i>cox1</i>	396	1	AF181889	Lee, Huh, 2004

n – количество нуклеотидных последовательностей.

клонирование короткого участка ITS1 (397 пн) для образца 1.16. Для этого получили ПЦР-продукт с помощью прямого (BD1) и обратного (R1i15) праймеров. Реакционная смесь (20 мкл) для амплификации содержала следующие компоненты: 5 пкМ каждого праймера, Taq-буфер с 50 мМ KCl и 1.5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ дНТФ, смесь полимераз Taq и Pfu в соотношении 8:1 (Thermo Scientific, Литва) и 4 мкл ДНК. Программа для амплификации соответствовала программе для получения полноразмерного фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, за исключением увеличения времени синтеза до 3 мин и дополнительного синтеза при 72 °С в течение 50 мин для образования липких концов (то есть 3'-конца с некоплементарным дезоксиаденозином). Клонирование проводили с использованием InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit (Thermo Scientific, Литва), следуя инструкциям производителя.

Перед началом клонирования полученный ПЦР-продукт лигировали с плазмидным вектором *pTZ57R/T* в 14 мкл смеси. Состав смеси был следующим: 90 нг ПЦР-продукта, 110 нг плазмидного вектора, 12.5 е.а. Т4 ДНК-лигазы, 15 мМ АТФ, 3 мкл 5X буфера и 3 мкл ПЭГ 4000. Пробирки со смесью погружали в воду и инкубировали в течение 24 часов при температуре 4 °С. Затем лигазу инактивировали при температуре 68 °С в течение 10 мин.

Клонирование включало в себя следующие этапы:

1. К 100 мкл бактериального штамма *Escherichia coli* XLBlue в среде Лурия-Бертани (LB) добавляли 900 мкл С-среды и инкубировали смесь в течение 1 часа при 37 °С.

2. Затем бактериальную среду центрифугировали при 7200 об./мин при 4 °С в течение 1 мин. Супернатант сливали.

3. Осадок ресуспендировали в 300 мкл Т-раствора (смеси растворов А и В) и помещали на лед на 5 мин.

4. Затем бактериальную среду центрифугировали при 7200 об./мин при 4 °С в течение 1 мин. Супернатант сливали.

5. Осадок ресуспендировали в 120 мкл Т-раствора и помещали на лед на 5 мин. Одновременно на лед ставили 2 пробирки с лигированной смесью по 5 мкл в каждой.

6. В обе пробирки с лигированной смесью добавляли по 60 мкл бактерий в Т-растворе, перемешивали и помещали на лед на 5 мин.

7. Раствор переносили шпателем на 2 чашки Петри с LB-ампициллиновым агаром и инкубировали 16 часов при 37 °С.

Выращенные колонии проверяли на наличие вставок амплификацией с использованием универсальных праймеров: прямого M13-F (-20) (5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3') и обратного M13-R (-24) (5'-AAC-AGC-TAT-GAC-CAT-G-3'). ПЦР-смесь содержала 5 пкМ каждого праймера, Таq-буфер с 50 мМ KCl и 1.5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ дНТФ и 1.0 е.а. смеси полимераз и 1 колонию. Условия реакции: предварительная денатурация – 3 мин при 96 °С, затем 30 циклов: денатурация (40 сек при 93 °С), отжиг праймера (40 сек при 57 °С), синтез (4 мин

при 72 °С). Завершался процесс дополнительным синтезом в течение 10 мин при 72 °С и охлаждением до 4 °С. Вставка обнаружена в 20 колониях. Секвенирование клонированных фрагментов проводили с помощью праймеров M13-F (-20) и M13-R (-24) по методике, описанной выше.

2.6. Статистический анализ молекулярных данных

2.6.1. Обработка данных секвенирования

С помощью пакетов статистических программ DnaSP ver. 5.10 (Librado, Rozas, 2009) и Arlequin ver. 3.11 (Excoffier et al., 2007) рассчитывали количество гаплотипов (H), полиморфных сайтов (S), уровень гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия (Nei, 1987).

Программу Arlequin ver. 3.11 использовали для расчета коэффициента F_{st} с помощью анализа молекулярной изменчивости AMOVA (Analysis of Molecular Variance) (Tajima, 1983). В этой же программе провели демографический анализ и получили значения временного коэффициента τ (время экспансии, соответствующее числу попарных отличий на этапе максимального роста численности популяции), а также начального и конечного значений $\tau - \theta_0$ и θ_1 (мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности популяции). Значение τ с 95% доверительным интервалом было рассчитано по формуле $\tau = 2\mu k$, где μ – скорость мутации каждого нуклеотида, k – число нуклеотидов. Значение τ переведено в абсолютное время в миллионах лет (t). Для этого использовали скорость нуклеотидных замен 2.5% на млн. лет, определенную Аттвудом с соавторами для частичной последовательности гена *cox1 Schistosoma mansoni* (Attwood et al., 2008). Стандартные тесты на нейтральность (дистанции Таджimy D (Tajima, 1989) и тест Фу F_s (Fu, 1997)) были использованы для проверки генетического равновесия в популяциях. Значимость критериев оценивали после 1000 случайных пермутаций.

В программе DnaSP ver. 5.10 построили график распределения нуклеотидных замен, а также график распределения числа различий между парами последовательностей ДНК в популяции, отражающий демографическую

историю популяции. Полученное распределение сравнили с теоретически ожидаемым распределением Пуассона. Для подтверждения гипотезы популяционной экспансии анализировали значения индекса шероховатости Харпендинга (HRI) и среднеквадратического отклонения (SSD), полученные в программе Arlequin ver. 3.11. Данные параметры отражают соответствие наблюдаемого и ожидаемого распределений попарных нуклеотидных отличий (Rogers, Harpending, 1992).

Тесты на дифференциацию провели двумя способами. Во-первых, получили значение точного теста в результате 10 000 случайных перестановок популяций (r) с различным количеством гаплотипов (k) (Raymond, Rousset, 1995). Во-вторых, использовали тест Мантеля с 1000 случайных отборов в онлайн-программе Isolation by Distance (IBD) Web Service ver. 3.23. В анализе использовали только выборки с 3 и более образцами. Данный тест оценивает корреляцию между генетическими и географическими дистанциями (Jensen et al., 2005). Помимо этого, в программе DnaSP ver. 5.10 оценивали генный поток (Nm) между популяциями.

2.6.2. Реконструкция внутривидовых филогенетических связей

Оптимальную модель для оценки генетического расстояния между последовательностями подбирали в программе Modeltest ver. 3.07 с учетом иерархического критерия правдоподобия (hLRTs) (Posada, Crandall, 1998). Внутри- и межвидовые филогенетические деревья строили на основе выбранной модели методами ML (максимального правдоподобия), NJ (ближайшего соседства) в программе PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002), а также методом Байеса (BI) в программе Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Деревья ML и NJ строили с заданным числом бутстреп-репликаций 100 и 1000 соответственно. Значения бутстреп-поддержки более 50% указывали в узлах ветвей. Для BI анализа создавали от 1 100 000 до 3 300 000 генераций цепей МСМС (цепи Маркова-Монте-Карло) с частотой отбора проб каждые 1000 генераций (temp = 0.5). Первые 250 проб исключались из анализа.

Помимо этого, для реконструкции внутривидовых филогенетических связей между риботипами участка ITS1, а также гаплотипами *cox1* гена построили деревья MST в программе Arlequin ver. 3.11 и медианные сети в программе Network ver. 4.6.1.0 (Bandelt et al., 1999).

2.6.3. Анализ вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 ядерной рДНК

Для построения вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 рДНК *C. sinensis* использовали программу Mfold ver. 3.0 (Zuker, 2003) на web-сервере <http://mfold.rit.albany.edu>. Конструирование проводили при фиксированной температуре 37 °С. Для анализа использовали структуры с наименьшим значением свободной отрицательной энергии. Для выявления мест локализации консервативных и переменных участков ITS2 получили также вторичную структуру для других видов семейства *Opisthorchiidae*: *Opisthorchis viverrini* (AY584735), *O. felinus* (EF688142) и *Metorchis orientalis* Tanabe, 1926 (HM347226). Поиск прямых тандемных повторов, а также длинных инвертированных повторов первичной нуклеотидной последовательности ITS-участков проводили в программе Unipro UGENE ver. 1.10. (<http://ugene.unipro.ru>).

2.6.4. Анализ предполагаемой молекулярной организации первой субъединицы белка цитохром *c*-оксидазы мтДНК

Аминокислотная последовательность COX1 получена через конвертирование нуклеотидной последовательности гена *cox1*. Схему третичной структуры белка первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы моделировали, взяв за основу трехмерную модель гомологичного белка быка (Tsukihara et al., 1996). Информацию по функциональным сайтам белка COX1 для *C. sinensis* получили из генного банка (индивидуальный номер образца *C. sinensis* – ACI95073; AGB56952 – белковая последовательность для *Bos taurus* Linnaeus, 1758).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе проанализировано 68 полноразмерных (1116/1121 пн) нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, 98 полных (657/662 пн) и 236 частичных (451/456 пн) последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и 20 клонов частичной последовательности ITS1 (434 пн) рибосомного кластера яДНК, а также 68 полноразмерных (1560 пн) и 107 частичных (324 пн) последовательностей гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*.

3.1. Анализ полноразмерной последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 ядерной рДНК

3.1.1. Нуклеотидные последовательности участка 5.8S-ITS2 рДНК и вторичная структура транскриптов ITS2

Полученные последовательности гена 5.8S рДНК для всей выборки с привлечением данных из генного банка оказались идентичными. За исключением единственной нуклеотидной последовательности ITS2 из Дананга (Вьетнам), для которой в позиции 145 пн обнаружен внутригеномный полиморфизм (двойной пик, трансверсия $G \leftrightarrow T$), все последовательности данного участка также идентичны. Длина последовательностей гена 5.8S и участка ITS2 рДНК составила 159 и 300 пн соответственно. GC-состав вышеуказанных участков равен 54.4 и 51.2% соответственно. Внутри последовательности ITS2 обнаружено 17 ди-, три- и тетрануклеотидных повторов. Из них повторы $(TTG)_2$ идентифицированы в трех локусах, а повторы $(CC)_2$, $(GT)_2$, $(GG)_2$, $(TT)_2$, $(GTT)_2$ были выявлены в двух локусах каждый.

Предполагаемая вторичная структура участка ITS2 рибосомной ДНК (рис. 2) во многом повторяет структуру данного региона для других описторхид. Модель включает четыре спирали вокруг коровой структуры. Одна из спиралей (H3) существенно длиннее остальных. Основные межвидовые отличия

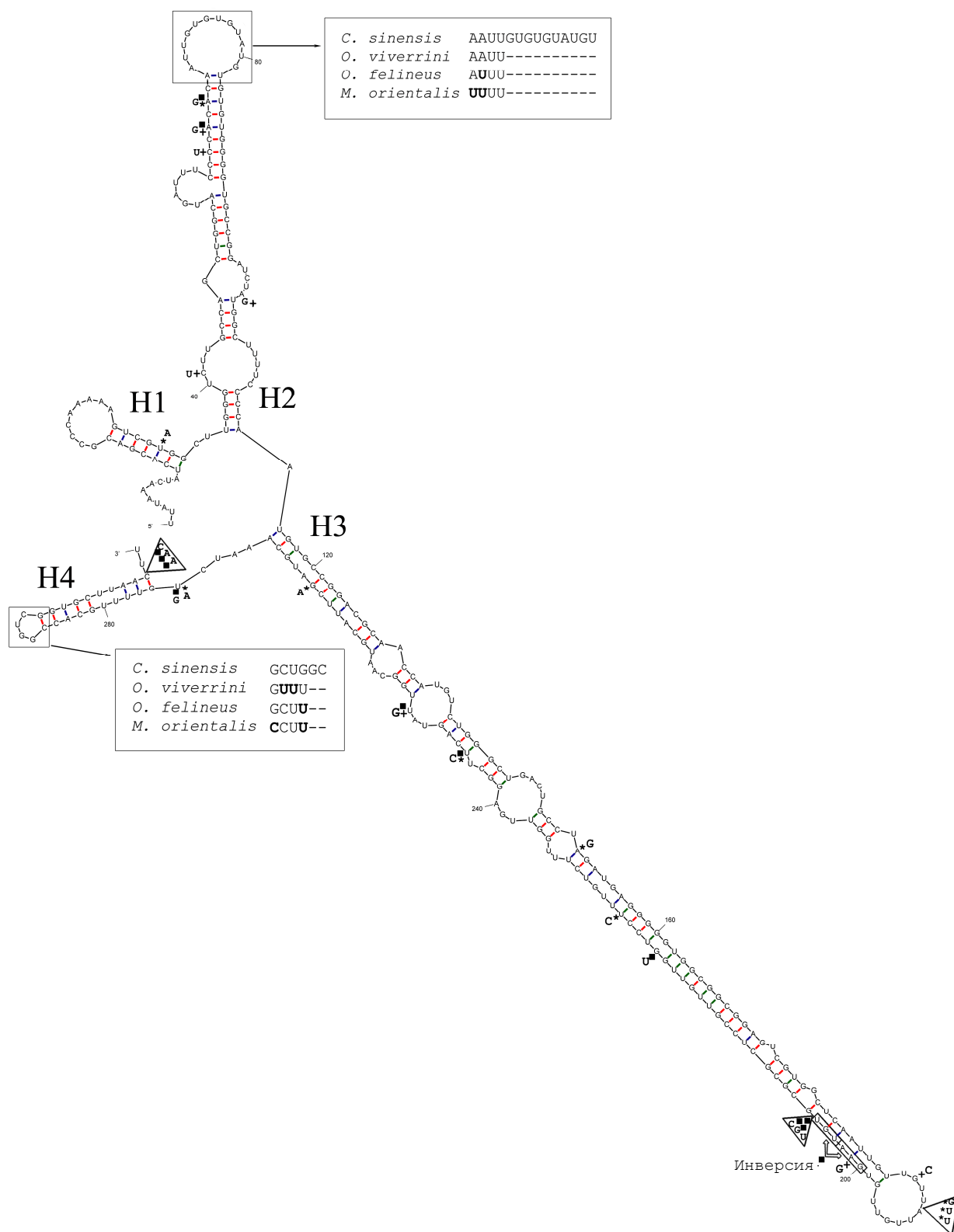


Рис. 2. Предполагаемая вторичная структура для транскрипта ITS2 *C. sinensis*, смоделированная в программе Mfold. Межвидовые отличия отмечены звездочками, квадратиками и плюсами для *Opisthorchis felineus* (EF688142), *O. viverrini* (AY584735) и *Metorchis orientalis* (HM347226) соответственно. Свободная энергия образования связей (dG) для данной модели равна -114.70

располагаются внутри участков на верхушках спиралей Н2, Н3 и Н4. В спиральных Н2 и Н4 ITS2 *C. sinensis* обнаружены соответственно 10 пн и 2 пн вставки, отсутствующие у других представителей описторхид.

3.1.2. Нуклеотидная изменчивость ITS1 рДНК и вторичная структура транскриптов ITS1

Длина последовательности ITS1 составила 657 и 662 пн. GC-содержание для данного участка рибосомного кластера равно 54.2%, а среднее количество попарных отличий (k) между последовательностями в полной выборке – 0.03%. В таблице 4 указаны параметры генетической изменчивости ITS1 в отдельных локалитетах, географических регионах и для всей выборки в целом.

Таблица 4

Описательная статистика генетической изменчивости последовательностей полноразмерного участка ITS1 рДНК *C. sinensis*

Выборка	n	H	S	π	k	D
Популяция						
Магдыковое	13	3	2	0.00102±0.00066	2.07692±1.24053	0-0.00305 (0.00102)
Кронштадтка	13	3	2	0.00079±0.00065	0.51282±0.46118	0-0.00153 (0.00078)
Кондратеновка	13	3	2	0.00126±0.00082	1.58974±1.00817	0-0.00305 (0.00125)
Тхайбинь	13	7	4	0.00102±0.00066	2.07692±1.24053	0-0.00306 (0.00102)
Дананг	13	5	3	0.00094±0.00064	1.38462±0.90885	0-0.00305 (0.00094)
Регион						
Россия	39	4	3	0.00103±0.00070	1.40351±0.87919	0-0.00305 (0.00103)
Вьетнам	26	8	4	0.00095±0.00062	1.68308±1.01902	0-0.00306 (0.00095)
Китай	18	11	11	0.00308±0.00122	4.83660±2.47539	0-0.00762 (0.00339)
Корея	15	5	4	0.00155±0.00091	4.19048±2.20492	0-0.00458 (0.00192)
Объединенная выборка	98	15	13	0.00156±0.00092	2.95035±1.55813	0-0.00766 (0.00156)

n – количество последовательностей; H – количество риботипов; S – количество полиморфных сайтов; π – нуклеотидная изменчивость (\pm S.D.); k – среднее количество попарных отличий (\pm S.D.); D – диапазон генетических дистанций, среднее значение указано в скобках.

Для всей выборки значения нуклеотидной изменчивости (π) и генотипического разнообразия (Hd) равны 0.00156 ± 0.00091 и 0.740 ± 0.023 соответственно. Таблица 4 демонстрирует, что нуклеотидная изменчивость для российских ($\pi = 0.001$; $k = 1.4$; $D = 0.001$) и вьетнамских ($\pi = 0.001$; $k = 1.7$; $D = 0.001$) выборок ниже, чем для образцов из Китая ($\pi = 0.003$; $k = 4.8$; $D = 0.003$) и Кореи ($\pi = 0.002$; $k = 4.1$; $D = 0.002$). При этом самое высокое значение параметров для России обнаружено в предположительно самой молодой популяции (Кондратеновка). В целом, все параметры генетической изменчивости для китайской выборки в 2-3 раза выше, чем для остальных регионов. Генетические дистанции между отдельными нуклеотидными последовательностями варьируют от 0 до 0.76%, со средним значением 0.16% для всей выборки.

Как генетические дистанции, так и индекс генной фиксации (табл. 5) не обнаруживают дифференциации между популяциями. Генетические дистанции между отдельными российскими и вьетнамскими популяциями существенно не отличаются от внутривидовых значений и от значений между географическими регионами (Россией и Вьетнамом). Генетические дистанции между китайской выборкой и выборками из других регионов более чем в 2 раза превышают значения, обнаруженные между выборками из России, Вьетнама и Кореи. F_{st} -статистика выявила низкую генетическую подразделенность между географическими регионами ($F_{st} = 0.194$) и между локальными популяциями, за исключением вьетнамских регионов, для которых не обнаружена статистически подтвержденная дифференциация.

При анализе нуклеотидной изменчивости полноразмерного участка ITS1 рибосомного кластера выявлено два уровня внутривидовой изменчивости: между геномами (образцами) и внутри генома. Внутривидовая изменчивость на уровне отдельных нуклеотидных последовательностей обнаружена как для российских, так и для вьетнамских образцов. При визуальной оценке сиквенсовых хроматограмм в позиции 114 пн ITS1 было идентифицировано четыре варианта:

чистый пик Т, чистый пик С и двойной пик (транзиция С ↔ Т) с преобладанием пика С или Т, в зависимости от образца (рис. 3, А-Г).

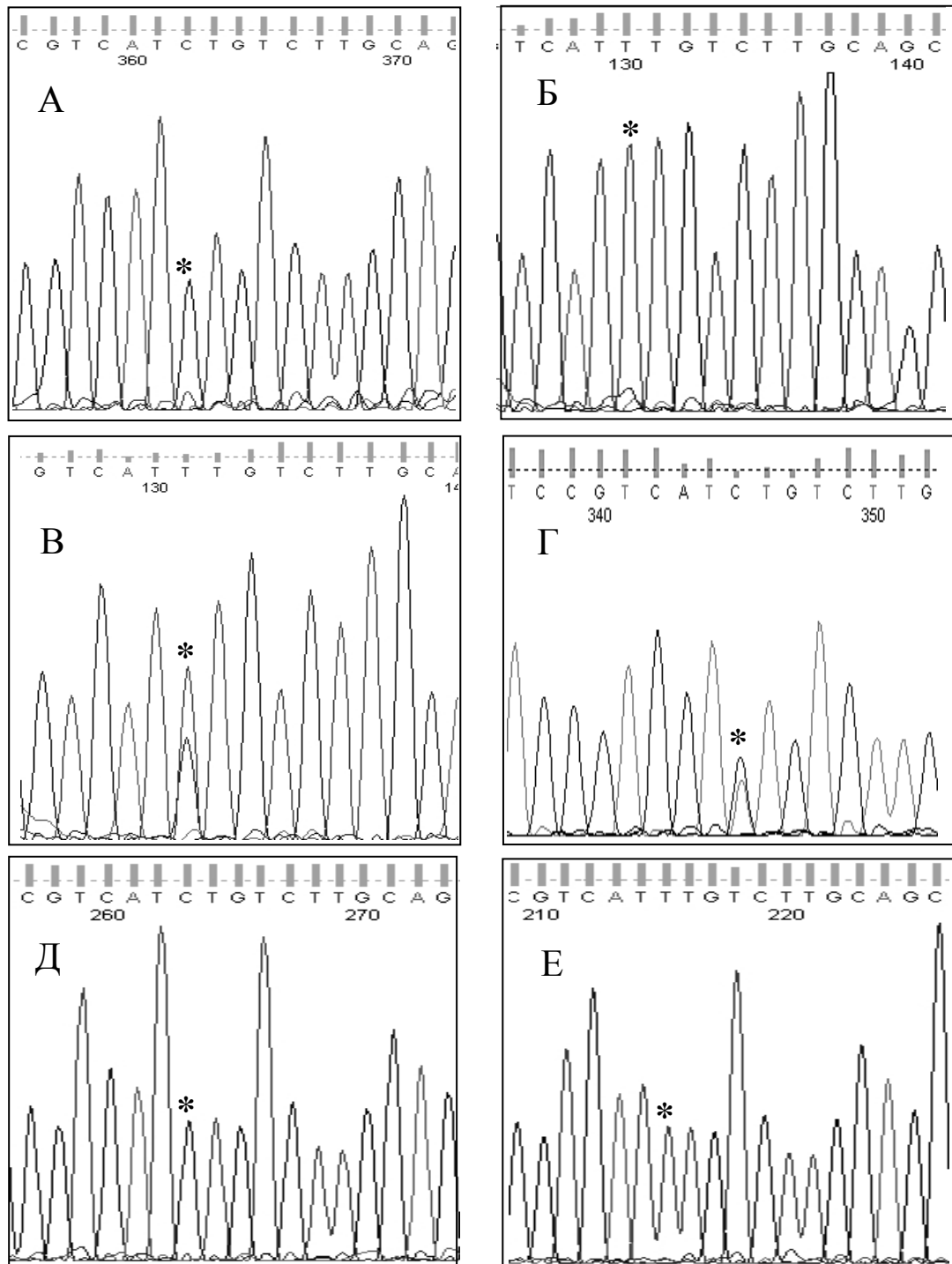


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм участка ITS1 рДНК: А – образец 1.14; Б – образец 24.11; В – образец 18.1; Г – образец 1.16; Д и Е – клонированные последовательности ITS1 для образца 1.16 с чистыми пиками С и Т соответственно; * – позиция 114 пн полной последовательности ITS1 с внутригеномным полиморфизмом (В, Г) и без него (А, Б, Д, Е)

Таблица 5

Индексы генетической дифференциации (выше диагонали D и ниже диагонали F_{st})
для полной последовательности ITS1 рДНК

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.00091 (0.00062)	0.00120 (0.00079)	0.00094 (0.00061)	0.00092 (0.00061)				
2	0.0486 ($P < 0.05$)		0.00101 (0.00070)	0.00091 (0.00061)	0.00082 (0.00060)				
3	-0.0092 ($P < 0.05$)	-0.0038 ($P < 0.05$)		0.00120 (0.00079)	0.00111 (0.00074)				
4	-0.0833 ($P > 0.05$)	0.0486 ($P < 0.05$)	-0.00923 ($P < 0.05$)		0.00092 (0.00061)				
5	-0.0560 ($P > 0.05$)	-0.0344 ($P > 0.05$)	-0.03857 ($P > 0.05$)	-0.0560 ($P > 0.05$)					
6							0.00098 (0.00076)	0.00233 (0.00116)	0.00149 (0.00098)
7						-0.01861 ($P > 0.05$)		0.00228 (0.00113)	0.00138 (0.00091)
8						0.34428 ($P < 0.05$)	0.26341 ($P < 0.05$)		0.00230 (0.00105)
9						0.28403 ($P < 0.05$)	0.19097 ($P < 0.05$)	0.03340 ($P > 0.05$)	

1 – Магдыковое; 2 – Кронштадтка; 3 – Кондратеновка; 4 – Тхайбинь; 5 – Дананг; 6 – Россия; 7 – Вьетнама; 8 – Китай; 9 – Корея; F_{st} – коэффициент генной фиксации (Arlequin); P – уровень достоверности отличий ($P \leq 0.05$ считается существенным); D – генетические дистанции (MEGA), в скобках указано значение стандартной ошибки.

Повторные эксперименты и использование прямого и обратного праймеров подтвердили полученные результаты для всех исследуемых образцов.

Для подтверждения отсутствия ошибок при прямом секвенировании было проведено клонирование участка ITS1 для образца 1.16 (с. Кронштадтка, Россия) с высотой С и Т пиков в позиции 114 пн приблизительно 63 и 37% соответственно. В результате получили 2 типа клонов с чистыми пиками: С – 70%, Т – 30% (рис. 3, Д, Е).

В разных популяциях из России и Вьетнама обнаружено различное количество нуклеотидных последовательностей с двойным пиком в позиции 114 пн (рис. 4, А). Больше всего таких последовательностей представлено в выборке из провинции Тхайбинь (77%), а наименьшее количество обнаружено в Кронштадтке (23%).

В суммарной выборке российских популяций соотношение риботипов ТТ, СС и СТ в данном вариабельном сайте составило 10, 44 и 46% соответственно. Процентное соотношение для вьетнамской выборки существенно отличается: 8, 23 и 69%. По данным генного банка в остальных популяциях присутствуют только гомозиготы по данному признаку. Частота присутствия цитозина в позиции 114 пн для Китая и Кореи составляет 61 и 80% соответственно.

Внутригеномный полиморфизм был также обнаружен для позиции 339 пн (транзиция С ↔ Т) (рис. 4, Б). Однако двойной пик был выявлен лишь у небольшого числа образцов: одна (3%) и шесть (23%) нуклеотидных последовательностей в российской и во вьетнамской популяциях соответственно. У остальных образцов российских и вьетнамских выборок в данной позиции присутствует тимин. Цитозин в позиции 339 пн обнаружен только в двух нуклеотидных последовательностях ITS1 из Китая и в двух последовательностях из Кореи, что составляет 11 и 13% китайской и корейской выборок соответственно. По данным генного банка выборки из остальных регионов представлены только гомозиготами по данному признаку.

Также у одного образца из Вьетнама в позиции 139 пн обнаружена транзикация G ↔ A. В других выборках полиморфизм в данной позиции отсутствует.

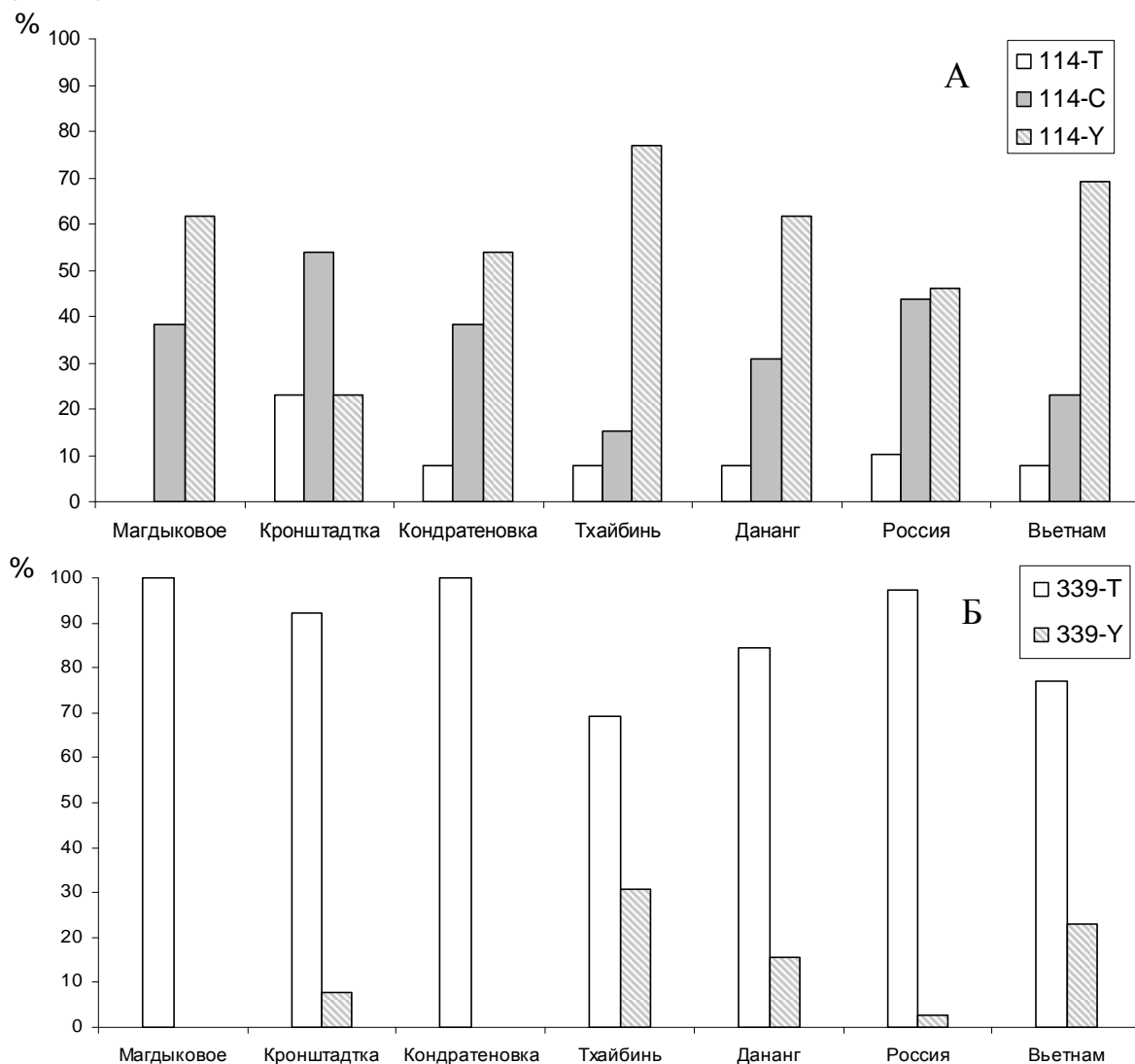


Рис. 4. Частота Т, С и С/Т (Y) пиков (в процентах) в позициях 114 (А) и 339 (Б) пн для различных популяций России и Вьетнама. В российских и вьетнамских выборках отсутствуют последовательности с чистым С-пиком в позиции 339 пн

Нуклеотидные различия между образцами обусловлены также наличием нуклеотидных замен и вставок/делеций. На рисунке 5 указаны места локализации мутаций для риботипов ITS1 исследуемой выборки *C. sinensis*.

Для полной выборки выявлено 13 (2%) полиморфных сайтов, из них информативными являются только 4 (31% от всех полиморфных сайтов). Большинство нуклеотидных замен представляют собой С ↔ Т транзиции

(62% от всех нуклеотидных замен). Помимо этого, обнаружена транзиция $G \rightarrow A$ (8%), и 30% замен представлены трансверсиями различного типа: $C \rightarrow A$, $T \rightarrow A$, $G \rightarrow C$, $G \rightarrow T$. Нуклеотидные замены вдоль последовательности ITS1 распределены неравномерно. В позициях 114, 339 и 507 пн данного региона концентрируется наибольшее количество нуклеотидных замен (рис. 6).

Изменчивость в последовательностях вызвана также наличием единичной делеции и единичной вставки нуклеотида, обнаруженных для корейского образца в позициях 207 и 610 пн, а также вставки размером 5 пн (515-519 пн), представленной во всех регионах с различной частотой (рис. 7). Последовательности со вставкой 5 пн не обнаружены только в российской популяции из Кронштадтки. Остальные выборки из России и Вьетнама содержали не более 15% образцов со вставкой. Таким образом, в обоих географических регионах количество нуклеотидных последовательностей со вставкой было относительно небольшим: 8 и 12% соответственно. Гораздо больше таких последовательностей выявлено для китайских и корейских выборок: 56 и 47% соответственно.

Вставка является повтором 5 предыдущих нуклеотидов GCCTG. Длина последовательности ITS1 может составлять 657 пн (без вставки) или 662 пн (со вставкой). При этом нужно отметить, что наличие вставки коррелирует с нуклеотидной заменой (трансверсией $G \rightarrow C$) в позиции 507 пн. Исключение составляет уникальная последовательность из самой южной российской популяции (Кондратеновка), для которой обнаружено наличие трансверсии и отсутствие вставки. Нуклеотидная изменчивость для последовательностей ITS1 размером 662 пн выше, чем в группе последовательностей без вставки (0.00127 ± 0.00062 vs. 0.00095 ± 0.00060), при этом группа со вставкой составляет меньшую часть исследуемой выборки (23% vs. 77%). Значение параметров генетической дифференциации между данными группами также существенно ($D = 0.00260 \pm 0.00172$; $F_{st} = 0.88426$).

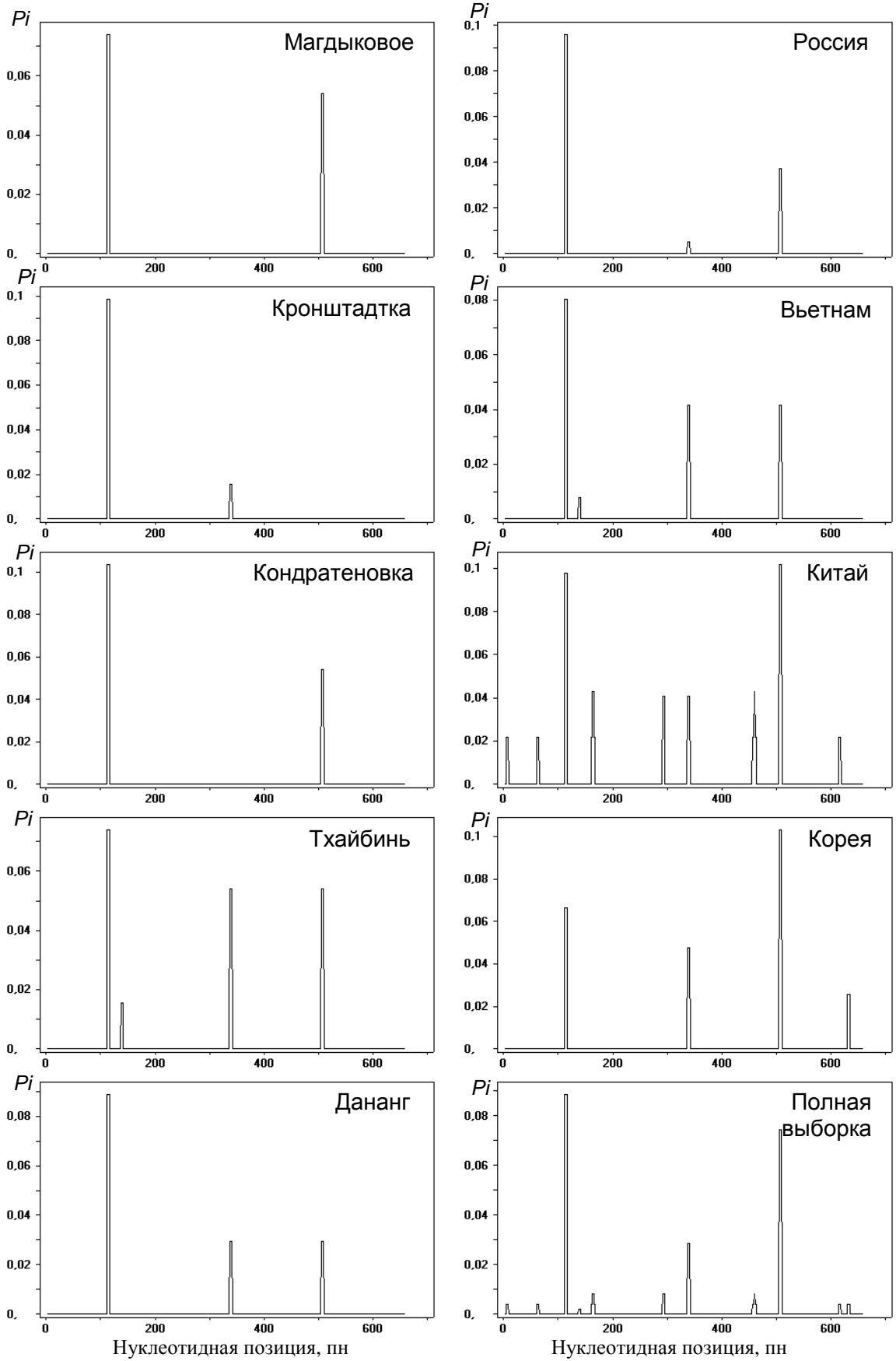


Рис. 6. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в последовательностях полноразмерного участка ITS1 рДНК *C. sinensis* из различных локалитетов и географических регионов

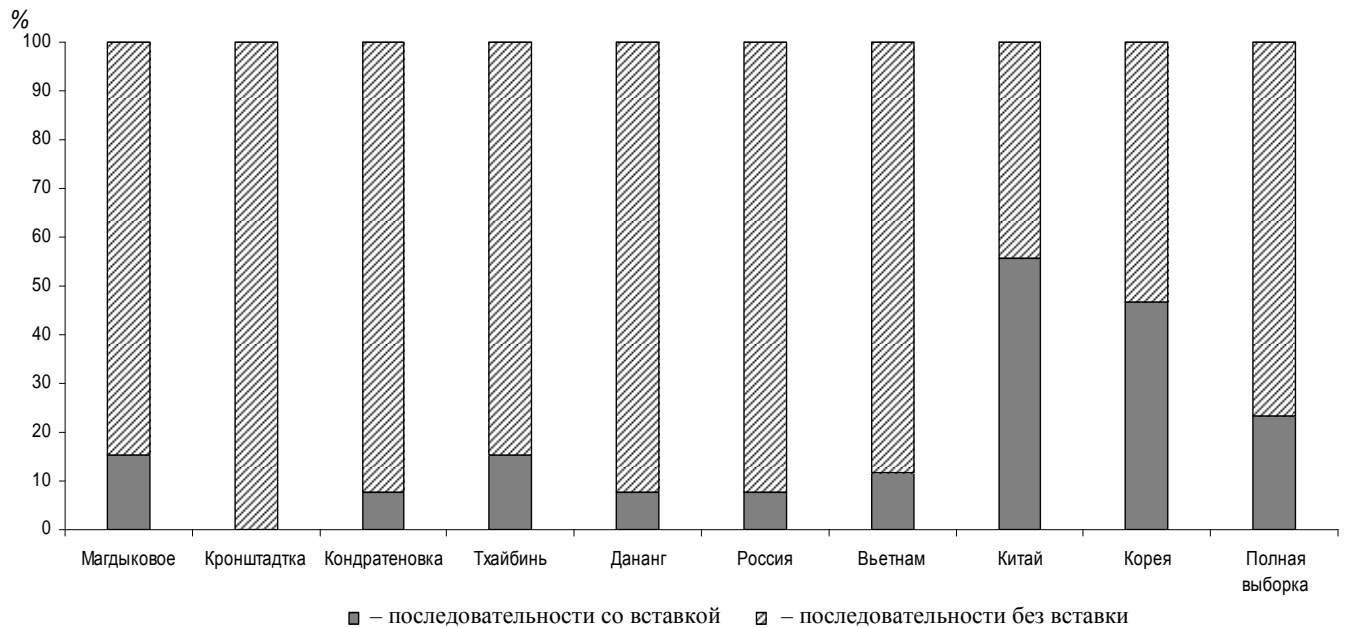


Рис. 7. Частота встречаемости 5 пн вставки в полной последовательности ITS1 для популяций и географических регионов

Вдоль нуклеотидной последовательности ITS1 расположены короткие ди-, три-, тетра-, пента- и гексаповторы или их вырожденные варианты (табл. 6). В полной выборке обнаружено 11 простых нуклеотидных повторов, 8 из которых оказались инвариабельными. Четыре повтора (TGGCTA, GGGCGG, TGTG и TGGCC) представлены более чем в одном локусе.

Помимо коротких повторов в анализируемой последовательности участка ITS1 выявлено три длинных прямых повтора размером 47-50 пн, сходных на 75.5-80% (рис. 8, А-В), а также один длинный инвертированный повтор размером 30 пн с 60% гомологией субповторов (рис. 8, Г). Только один из вышеперечисленных повторов (рис. 8, А) организован тандемно. В повторах обнаружены три GC-боксы: два GGGCGG и один CCGCCC.

Для оценки влияния вставки на вторичную структуру полноразмерного ITS1-транскрипта в программе Mfold была сконструирована возможная структура для нуклеотидных последовательностей с 5 пн вставкой и без нее (рис. 9). Полученные вторичные структуры состоят из двух сложно организованных ветвей, отделенных друг от друга довольно длинным двуспиральным участком.

Таблица 6

Короткие нуклеотидные повторы, выявленные внутри полной последовательности

ITS1 *C. sinensis*, и место их локализации

<i>n</i>	AC/CA 6 пн	GCCT 79 пн	GCCTG 505 пн	TGC 189 пн	TA 266 пн	TG 275, 376, 421, 581 пн	CG 291 пн	TGG 345 пн	TGGCC 503 пн	TGT 355 пн	CGG 593 пн
73	ACACA	(GCCT) ₂	GCCTG	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	TGGCC	(TGT) ₃	(CGG) ₂
1	AAACA	(GCCT) ₂	GCCTG	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	TGGCC	(TGT) ₃	(CGG) ₂
1	ACACA	(GCCT) ₂	(GCCTG) ₂	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	(TGGCC) ₂	(TGT) ₃	(CGG) ₂
19	ACACA	(GCCT) ₂	(GCCTG) ₃	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	(TGGCC) ₃	(TGT) ₃	(CGG) ₂
2	ACACA	(GCCT) ₂	(GCCTG) ₃	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	<i>CGTG</i>	(TGG) ₂	(TGGCC) ₃	(TGT) ₃	(CGG) ₂
1	ACACA	(GCCT) ₂	(GCCTG) ₃	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	(TGGCC) ₃	<i>TGTCGTTGT</i>	(CGG) ₂
1	ACACA	(GCCT) ₂	(GCCTG) ₃	(TGC) ₂	(TA) ₃	(TG) ₂	(CG) ₂	(TGG) ₂	(TGGCC) ₃	<i>TGTTGTAGT</i>	(CGG) ₂

n – количество нуклеотидных последовательностей с данным риботипов; мутации в повторах выделены курсивом.

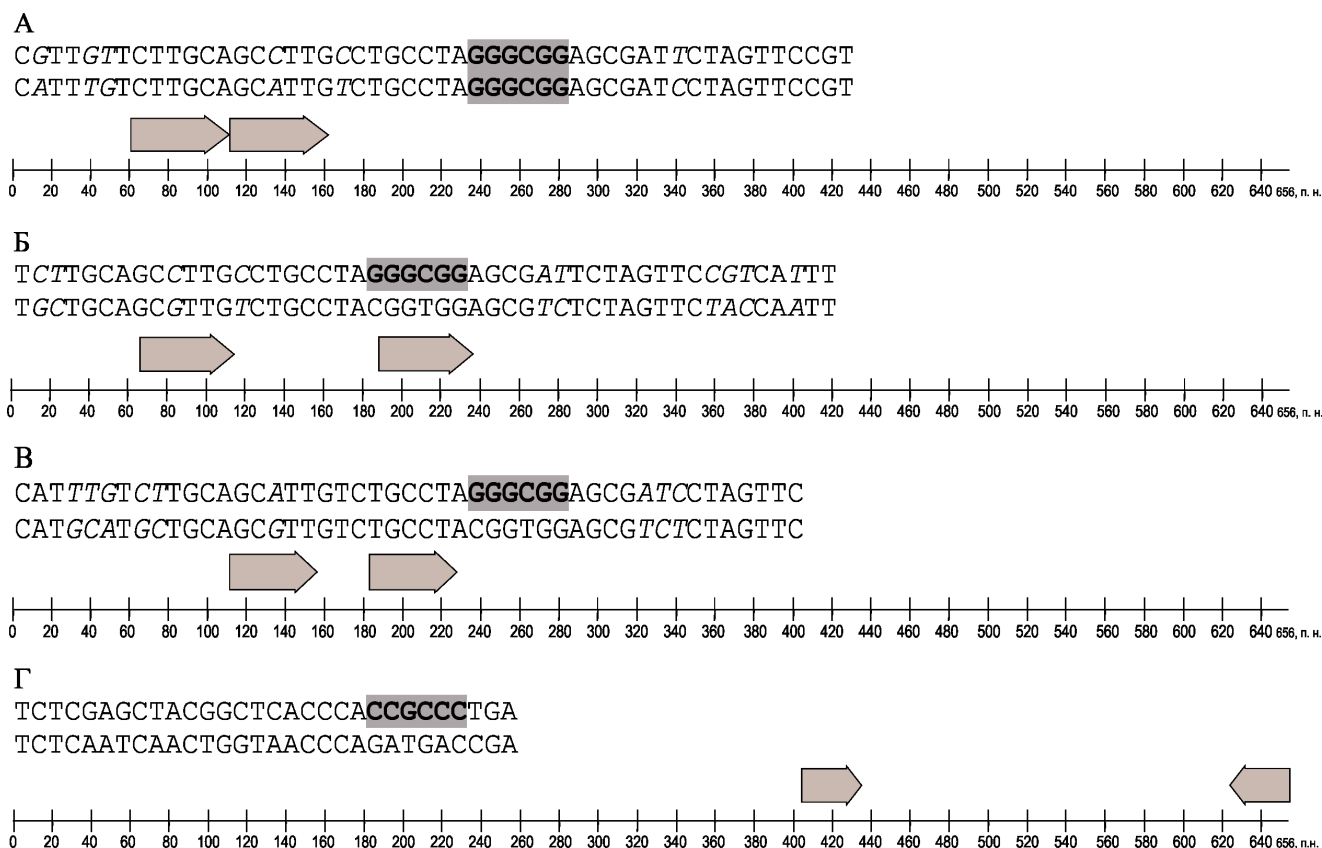


Рис. 8. Длинные повторы внутри ITS1 последовательностей *C. sinensis*, идентифицированные в программе Unipro UGENE ver. 1.10. (<http://ugene.unipro.ru>). А, Б и В – прямые субповторы, сходные на 80, 75.5 и 76.6% соответственно; Г – инвертированный субповтор с 60% идентичностью. Стрелки показывают место расположения субповторов внутри участка ITS1. Нуклеотидные отличия между субповторами выделены курсивом. GC-боксы выделены полужирным шрифтом и серым цветом

Одна из ветвей инвариантна, а конформация другой зависит от длины нуклеотидной последовательности ITS1. Данная ветвь включает в себя 3' и часть 5'-концов транскрипта ITS1 и образует небольшую открытую петлю. Отличия между предполагаемыми моделями с различными значениями свободной энергии гораздо меньше при увеличении длины участка ITS1 (наличие 5 пн вставки).

Распределение изменчивости вдоль исследованного участка ITS1 рДНК *C. sinensis* неравномерно. Длинный двуспиральный участок, соединяющий разветвленные ветви, является зоной пониженной изменчивости: в нем

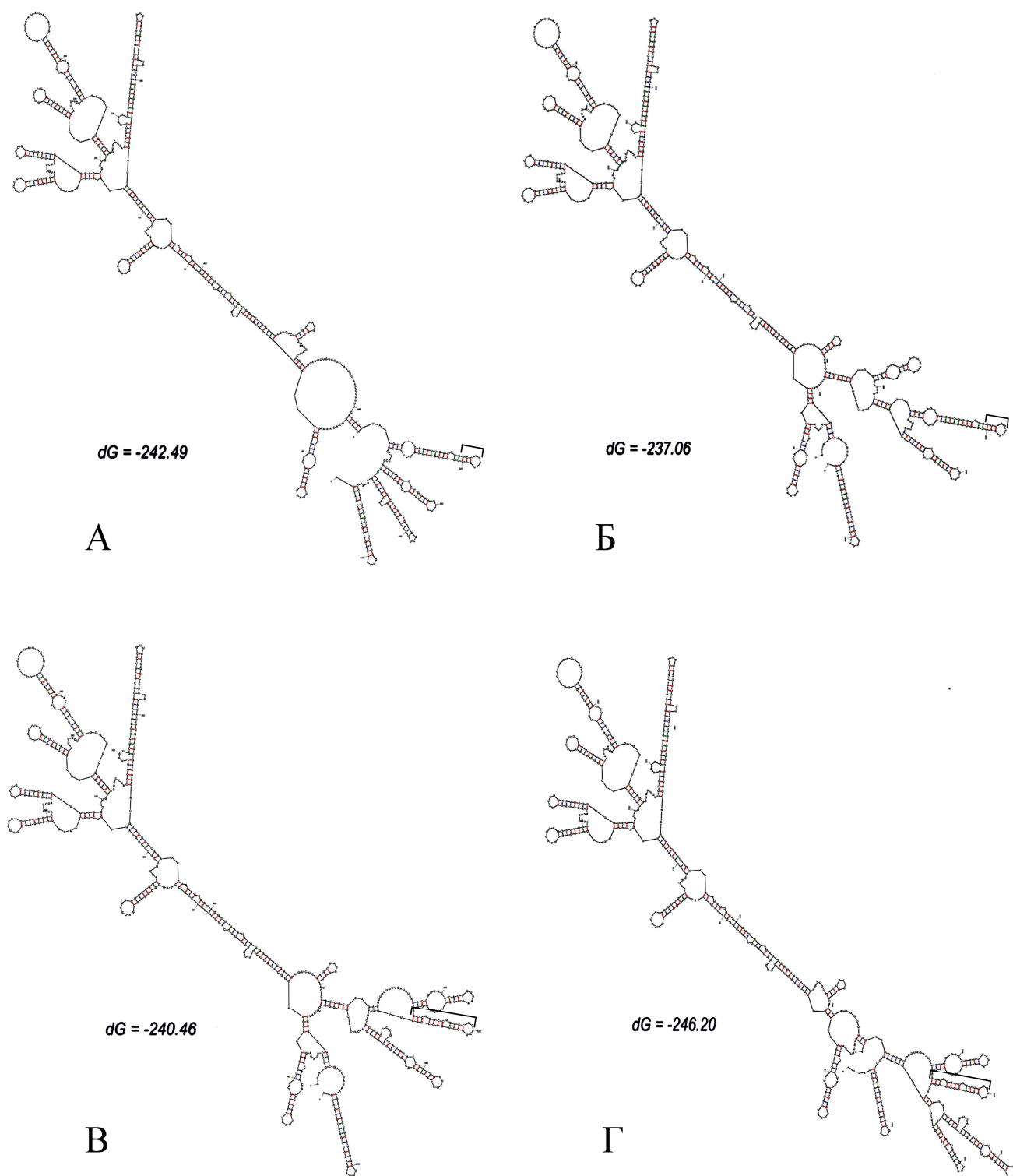


Рис. 9. Предполагаемые вторичные структуры для транскриптов ITS1 *C. sinensis*. А и Б – структуры для последовательностей без вставки; В и Г – структуры для последовательностей с 5 пн вставкой. Скобкой обозначены 5 пн повторы. Наименьшее значение свободной энергии вторичной структуры ($dG = -246.20$ ккал/моль) получено для нуклеотидных последовательностей ITS1 с 5 пн вставкой

обнаружены только две транзиции (12.5% от всех мутаций). Большинство мутаций, в том числе все вставки и делеции, расположены в спиральных участках разветвленных ветвей I и II: 19 и 37% соответственно. Оставшиеся нуклеотидные замены (31.5%) находятся в шпильках и петлях обеих ветвей (рис. 10).

3.1.3. Внутривидовые филогенетические отношения по данным изменчивости полной последовательности ITS1 рДНК

Деревья NJ, ML и BI имеют неразрешенную топологию. За исключением единственной ветви с бутстреп-поддержкой 60-68% для различных деревьев, включающей два образца из Китая, бутстреп-поддержка всех ветвей не превышала 11% (данные не показаны). Поэтому для анализа внутривидовых филогенетических отношений был использован алгоритм построения дерева минимальной протяженности (MST). Однако построение данного дерева затруднялось наличием внутривидового полиморфизма в позициях 114, 139 и 339 пн. Так, например, программа Arlequin не рассчитывала дистанции между риботипами Y (T/C), T и C. Поэтому данные риботипы и дистанции между ними условно обозначили, как «нулевые», поскольку реальные дистанции (то есть количество замен) между ними имели значение < 1 .

Полученное дерево (рис. 11) демонстрирует, что все риботипы разделяются на две группы (с 5 пн вставкой и без нее). Каждая группа включает в себя один мажорный риботип с отходящими от него уникальными риботипами. Мажорный риботип без вставки объединяет 6 «нулевых» риботипов и содержит 71% всех нуклеотидных последовательностей. Мажорный риботип со вставкой включает 5 вариантов «нулевых» риботипов (отсутствует вариант 114-Y/339-Y). В данном риботипе присутствует уникальный «нулевой» риботип с двойным пиком A/G в позиции 139 пн. Для риботипов со вставкой обнаружено меньше последовательностей с внутригеномным полиморфизмом, чем для группы риботипов без вставки (7% vs. 48%). Указанные группы связаны через уникальную нуклеотидную последовательность, принадлежащую самой южной популяции России (Кондратеновка). В данной последовательности в позиции 507

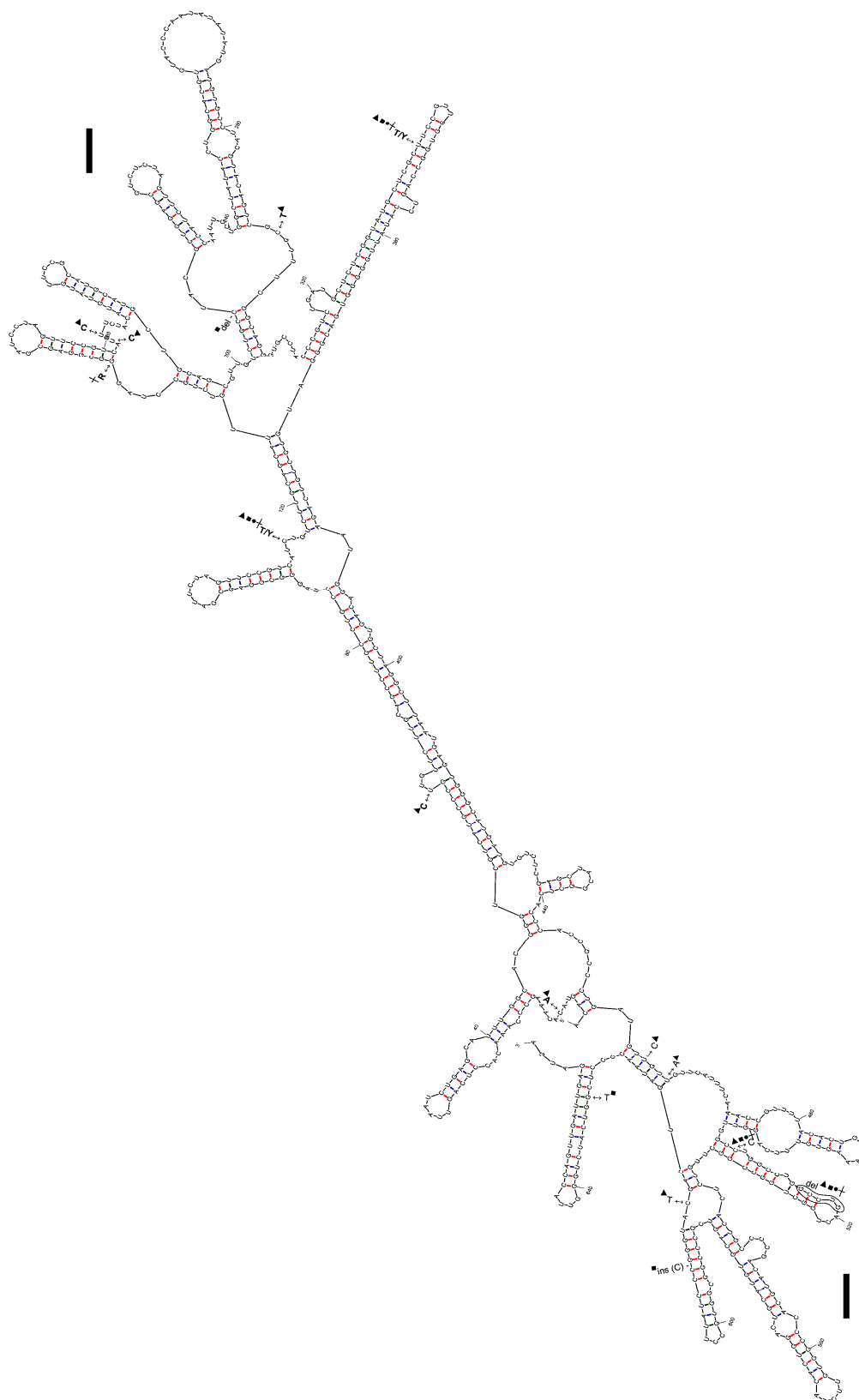


Рис. 10. Расположение нуклеотидных замен на вторичной структуре транскрипта ITS1 *C. sinensis* (для построения использована нуклеотидная последовательность с 5 пн вставкой; $dG = -246.20$ ккал/моль). ●, †, ▲, ■, — обозначение места локализации мутаций для популяций России, Вьетнама, Китая и Кореи соответственно; ins – вставка, del – делеция. I и II – разветвленные ветви

Последовательности
без вставки

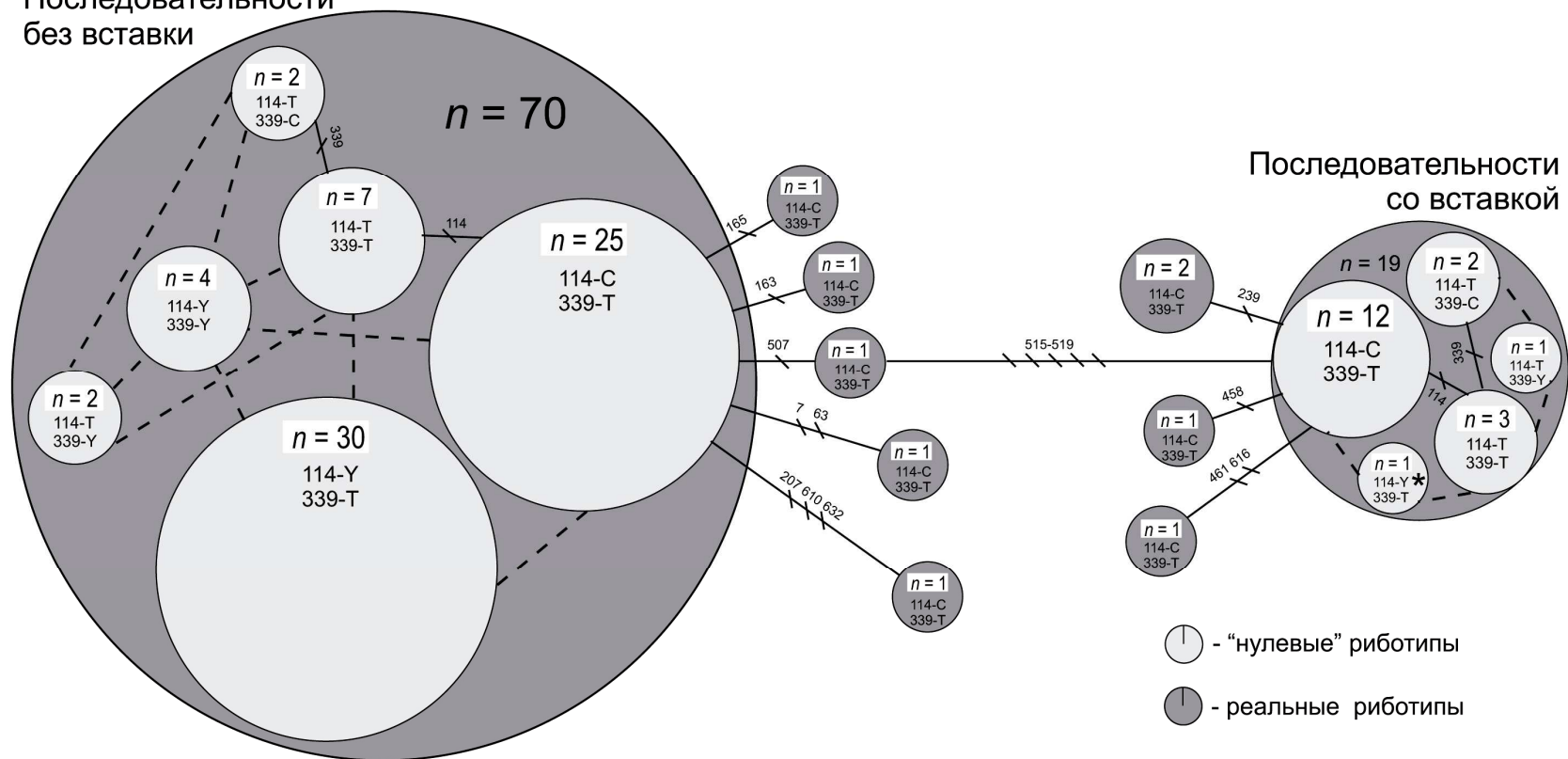


Рис. 11. Дерево минимальной протяженности (MST) для риботипов полной последовательности ITS1 рДНК *C. sinensis*. n – количество образцов в риботипе; количество замен между риботипами отмечено поперечными штрихами, цифрами указаны места локализации нуклеотидных замен; «нулевые» риботипы – риботипы, между которыми нет реальных дистанций (нуклеотидных замен), несмотря на наличие внутригеномного полиморфизма в позициях 114, 139 и 339; * – уникальный риботип с внутригеномным полиморфизмом в 139 позиции; Y – внутригеномный полиморфизм C/T; R – внутригеномный полиморфизм A/G; пунктирными линиями отмечены связи между «нулевыми» риботипами (см. в тексте)

пн выявлена трансверсия $G \rightarrow C$, характерная для последовательностей с 5 пн вставкой. Примечательно, что все производные от мажорных риботипов последовательности представлены образцами из Китая, за исключением одного риботипа из Кореи. Все эти последовательности (как со вставкой, так и без нее) в позициях 114 пн и 339 пн имеют пики С и Т соответственно.

В полной выборке для полноразмерной последовательности участка ITS1 с учетом внутригеномного полиморфизма идентифицировано 19 риботипов (рис. 12).

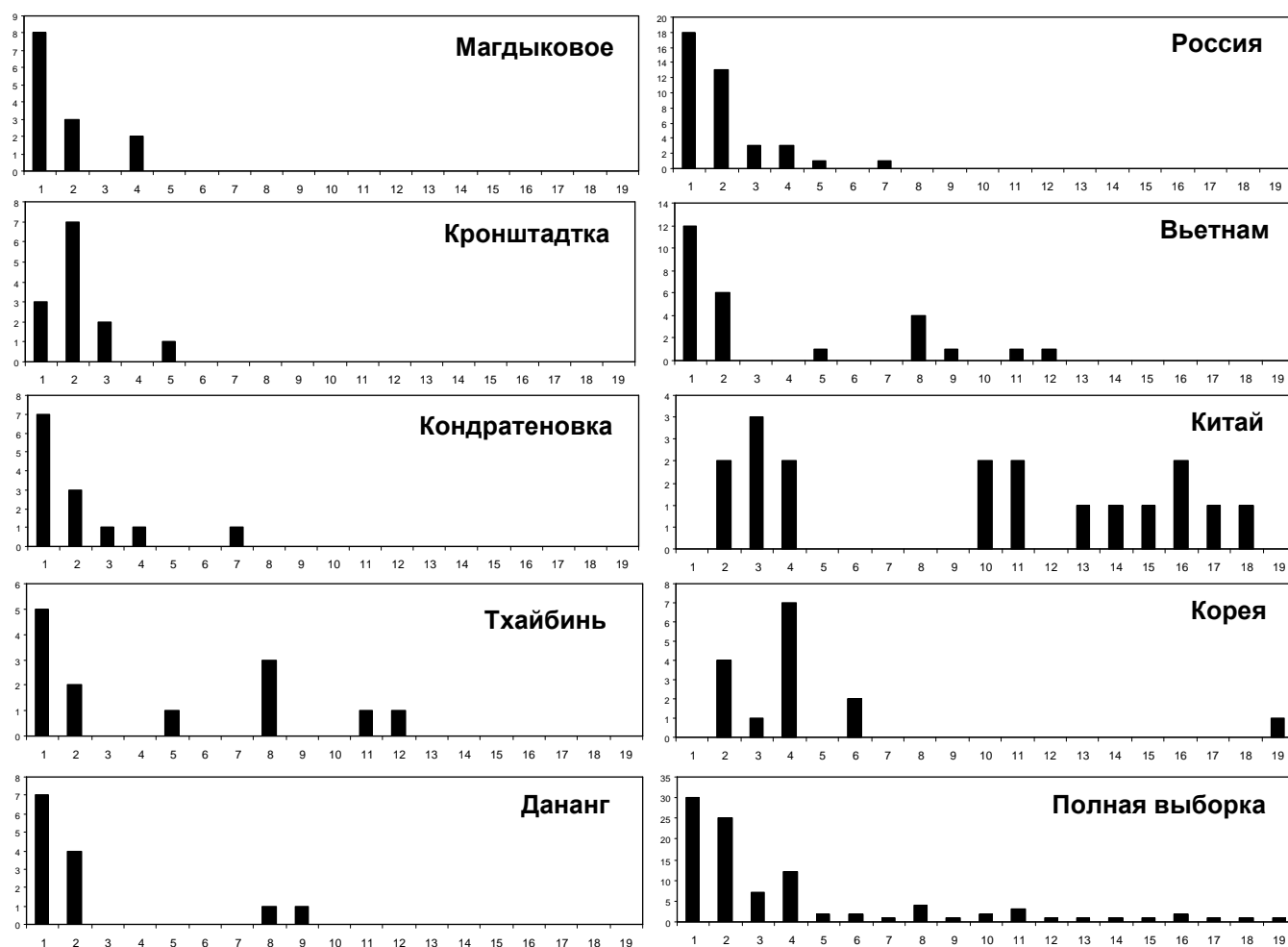


Рис. 12. Частоты риботипов полноразмерного участка ITS1 для образцов *C. sinensis*. Ось x – номер риботипа; ось y – количество нуклеотидных последовательностей в риботипе

Наибольшее количество риботипов обнаружено в китайской выборке (11 из 19). В российских популяциях количество риботипов увеличивается с севера на

юг: от 3 до 5. Во вьетнамских выборках также выявлено небольшое разнообразие риботипов. Только один риботип (№ 2; 114-С/339-Т) представлен с различной частотой во всех исследуемых выборках из разных стран. В российской выборке этот риботип составляет 33% всех нуклеотидных последовательностей. В остальных странах он распространен меньше: 23% во Вьетнаме, 20% в Корее и 11% в Китае. Помимо этого, выявлено еще два общих риботипа (№ 3 и № 4) для России, Китая и Кореи. Частота риботипа № 3 в данных выборках варьирует от 7 до 17%, а частота риботипа № 4 составляет 8, 11 и 47% для России, Китая и Кореи соответственно. Для России и Вьетнама обнаружено 3 общих риботипа (№ 1, № 2 и № 5). Первый является мажорным и составляет 46% для обеих выборок. Риботип № 5 в обеих выборках представлен одной нуклеотидной последовательностью. Помимо этого, обнаружено 2 общих для Вьетнама и Китая риботипа (№ 2 и № 11). Частота риботипа № 11 в этих странах составляет 4 и 11% соответственно.

3.2. Анализ частичной последовательности ITS1 ядерной рДНК

3.2.1. Нуклеотидная изменчивость частичной последовательности участка ITS1

Всего в анализ включено 236 частичных последовательностей ITS1. Длина анализируемого участка после выравнивания нуклеотидных последовательностей составила 451/456 пн (с учетом вставки). Первая позиция короткого фрагмента ITS1 соответствует 152 нуклеотиду полной последовательности данного участка.

В таблице 7 указаны параметры генетической изменчивости для отдельных локалитетов, географических регионов (в том числе китайская выборка разделена на северный, центральный и южный регион) и объединенной выборки. Полученные данные свидетельствуют, что уровень нуклеотидной изменчивости для китайской и корейской выборок в 2.5-3 раза выше, чем для выборок из России и Вьетнама. Самое высокое значение данного параметра среди российских локалитетов выявлено в выборке из Хабаровского края. Для всей выборки

значение нуклеотидной изменчивости (π) равно 0.00585 ± 0.00346 , что почти в 4 раза превышает значение данного параметра по полному фрагменту.

Таблица 7

Описательная статистика для генетической изменчивости частичных последовательностей ITS1 *C. sinensis*

Выборка	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	π	<i>k</i>	<i>D</i>
Популяция						
Хабаровский край, р. Амур	13	2	2	0.00433 ± 0.00294	1.97436 ± 1.19193	0-0.00445 (0.00125)
Магдыковое	13	2	1	0.00371 ± 0.00261	1.69231 ± 1.05744	0-0.00222 (0.00063)
Приморский край, Дальнереченск-й район, р. Большая Уссурка	5	3	2	0.00000	0.00000	0.00000
Кронштадтка	13	2	1	0.00000	0.00000	0.00000
Приморский край, Анучинский район, р. Арсеньевка	8	2	1	0.00329 ± 0.00251	1.50000 ± 1.00572	0-0.00222 (0.00056)
Кондратеновка	13	3	1	0.00231 ± 0.00184	1.05128 ± 0.74436	0-0.00222 (0.00063)
Тхайбинь	13	3	2	0.00371 ± 0.00261	1.69231 ± 1.05744	0-0.00223 (0.00063)
Дананг	13	3	2	0.00202 ± 0.00168	0.92308 ± 0.67957	0-0.00223 (0.00034)
Регион						
северный Китай	45	14	15	0.00748 ± 0.00433	3.41212 ± 1.77824	0-0.01569 (0.00339)
центральный Китай	31	5	7	0.00892 ± 0.00509	4.06882 ± 2.08538	0-0.01569 (0.00417)
южный Китай	52	9	10	0.00604 ± 0.00361	2.75490 ± 1.48332	0-0.01342 (0.00404)
Россия	65	6	3	0.00242 ± 0.00178	1.10337 ± 0.73187	0-0.00223 (0.00014)
Вьетнам	26	4	2	0.00279 ± 0.00202	1.27385 ± 0.82745	0-0.00223 (0.00047)
Китай	128	19	18	0.00751 ± 0.00428	3.42298 ± 1.76168	0-0.01569 (0.00399)
Корея	17	4	2	0.00771 ± 0.00462	3.51471 ± 1.88211	0-0.00446 (0.00167)
Объединенная выборка	236	26	19	0.00585 ± 0.00346	2.66938 ± 1.42748	0-0.01352 (0.00178)

n – количество последовательностей; *H* – количество риботипов; *S* – количество полиморфных сайтов; π – нуклеотидная изменчивость (\pm S.D.); *k* – среднее количество попарных отличий (\pm S.D.); *D* – диапазон генетических дистанций, среднее значение указано в скобках.

Среднее количество попарных отличий (k) между частичными последовательностями ITS1 в полной выборке не отличается от значения для полной последовательности данного региона (0.03%). Генетические дистанции варьируют от 0 до 1.6%, со средним значением 1.4% для всей выборки. Наибольшее значение различий внутри популяций обнаружено для китайских популяций (1.6%). Величина данного параметра превышала значение генетических расстояний для популяций России, Вьетнама и Кореи в 3.5-7 раз.

Параметры генетической дифференциации (D и Fst) не выявили дифференциации между локальными и региональными выборками из разных стран (табл. 8).

Таблица 8

Индексы (выше диагонали D и ниже диагонали Fst) генетической дифференциации для частичной последовательности ITS1-участка рДНК

	Россия	Вьетнам	Китай	Корея
Россия		0.00000 (0.00000)	0.00172 (0.00060)	0.00000 (0.00000)
Вьетнам	-0.02442 ($P > 0.05$)		0.00172 (0.00060)	0.00000 (0.00000)
Китай	0.04250 ($P < 0.05$)	0.01600 ($P > 0.05$)		0.00172 (0.00060)
Корея	0.33461 ($P < 0.05$)	0.23027 ($P < 0.05$)	0.10074 ($P < 0.05$)	

Fst – коэффициент геновой фиксации (Arlequin); P – уровень достоверности отличий ($P \leq 0.05$ считается существенным); D – генетические дистанции (MEGA), в скобках указано значение стандартной ошибки.

Генетические дистанции между выборками из России, Вьетнама и Кореи равны нулю. Значение дистанций между выборкой из Китая и другими выборками (0.17%) не превышает генетические дистанции внутри каждой из выборок. Индекс геновой фиксации для объединенной выборки ($Fst = 0.066$)

указывает на низкую генетическую подразделенность между всеми географическими регионами.

Внутригеномный полиморфизм в позиции 188 пн (соответствует позиции 339 полной последовательности ITS1) помимо вышеописанных последовательностей обнаружен у образца KC987517 (генный банк) из выборки на р. Большая Уссурка (Приморский край, Россия). Двойной пик (трансверсия G ↔ C) в позиции 356 пн (соответствует позиции 507 полной последовательности ITS1) выявлен у единственного образца KC987516 из той же выборки.

Уровень полиморфизма короткого участка ITS1 составляет 4.21% (19 сайтов), при этом большинство полиморфных сайтов (74%) являются информативными. На рисунке 13 указаны переменные сайты риботипов частичной последовательности ITS1 для полной выборки *C. sinensis*. Образцы из северной, центральной и южной части Китая, полученные из генного банка, в 3'-конце исследуемой нуклеотидной последовательности (после 5 пн вставки) имеют 11 полиморфных сайтов, не выявленных в вышеописанной выборке из 98 полноразмерных последовательностей ITS1. При этом большинство замен (82%) являются трансверсиями различного типа: 1 C → A, 1 G → T, 1 T → A и 6 G ↔ C. Помимо этого, для новых последовательностей из Хабаровска выявлена ранее не обнаруженная транзиция C → T в позиции 56 пн. При анализе короткого фрагмента ITS1 выявлены только ранее описанные для полной последовательности варианты вставок и делеций.

Для всех последовательностей из России, Вьетнама и Кореи обнаруженные мутации располагаются на 5'-конце исследуемого участка, до повтора, формируемого нуклеотидной заменой в позиции 356 пн и 5 пн вставкой. В то же время, выборка из Китая помимо вышеуказанных последовательностей включает последовательности, нуклеотидные замены в которых локализируются после вставки. При этом в центральном и южном Китае обнаружены только последовательности с мутациями на 3'-конце, тогда как выборка из северного Китая включает оба варианта последовательностей. В полной выборке не

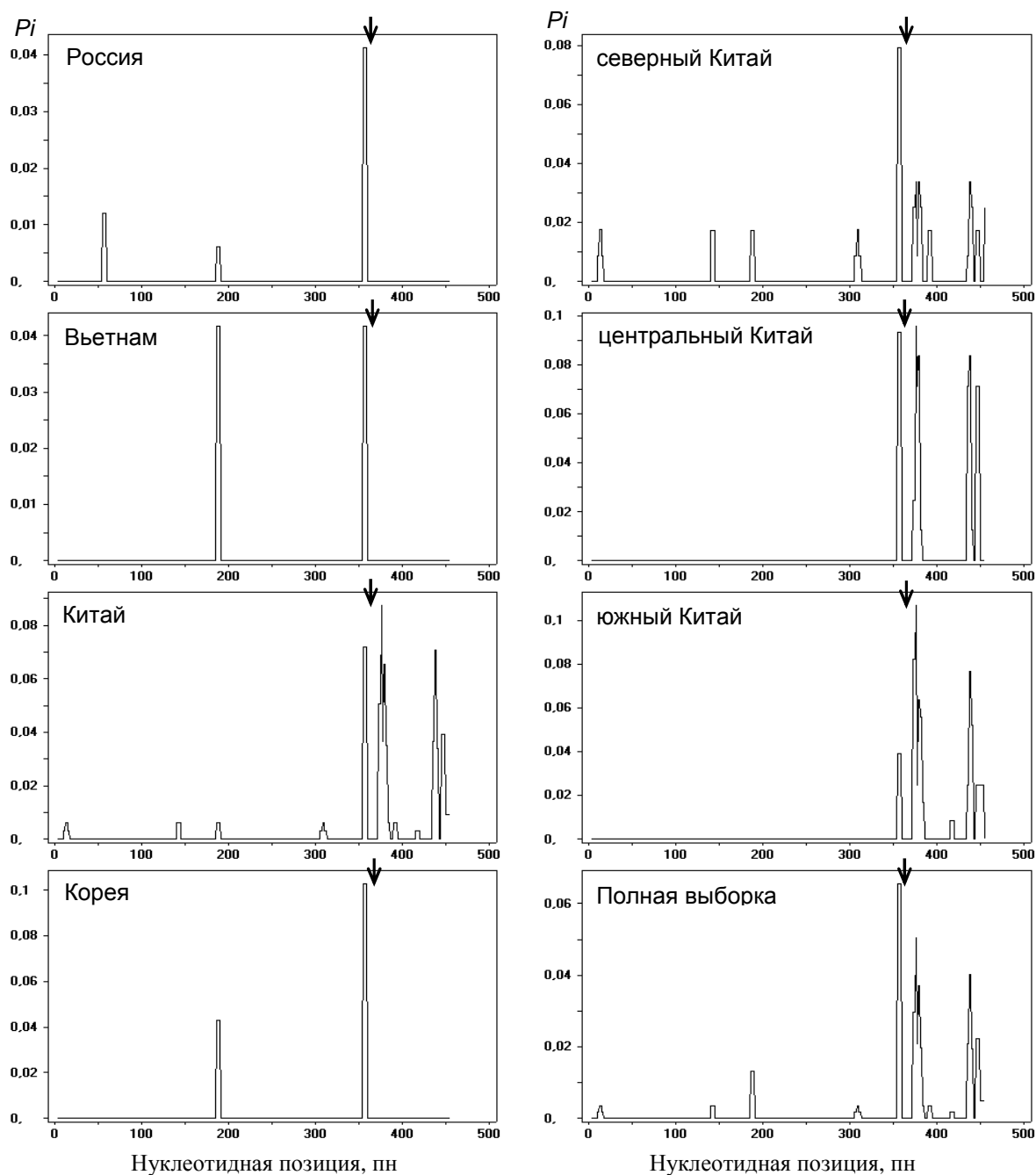


Рис. 14. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в частичной последовательности ITS1 рДНК *C. sinensis* из различных географических регионов. Стрелкой отмечено расположение 5 пн вставки

В целом, нуклеотидные замены представлены неравномерно вдоль исследуемой частичной последовательности ITS1 (рис. 14): в полной выборке до 5 пн вставки располагаются только 42% всех нуклеотидных замен, остальные замены (58%) выявлены после вставки. При этом участок до вставки (5'-конец)

составляет 80% всей последовательности, а участок после вставки (3'-конец) – 19%.

При описании мутационного профиля полноразмерного участка ITS1 мы указали на наличие в Кондратеновке (Россия) уникальной нуклеотидной последовательности с трансверсией G ↔ C в позиции 507 пн (356 позиция короткого фрагмента). При анализе данных фрагмента ITS1 подобные последовательности были обнаружены во всех китайских регионах: 2 нуклеотидные последовательности (HQ874523, HQ874525) из южного Китая и по одной последовательности из центрального (HQ874524) и северного (HQ874528) Китая. Помимо этого, уникальный риботип KC987516 (генный банк) из выборки на р. Большая Уссурка (Россия) в позиции 356 пн имеет двойной пик G/C при отсутствии вставки.

Пентануклеотидная вставка (364-368 пн) представлена во всех географических регионах с различной частотой (рис. 15).

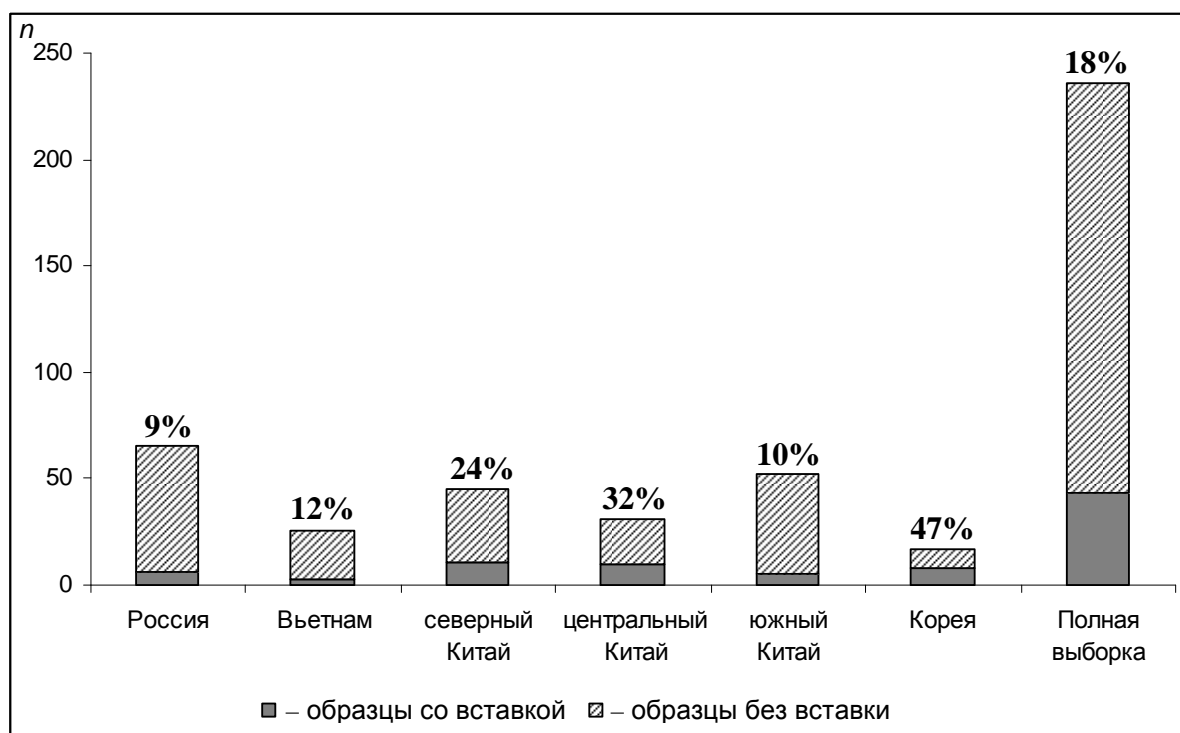


Рис. 15. Частота встречаемости 5 пн вставки (значение указано в %) в частичной последовательности ITS1 для географических регионов. *n* – количество образцов

За счет увеличения набора данных из генного банка количество частичных последовательностей ITS1 со вставкой увеличилось для российской выборки до 9%. Для выборок из Вьетнама и Кореи данное значение не изменилось (12 и 47% соответственно). Увеличение выборки из Китая уменьшило количество последовательностей со вставкой до 20%. В основном такое резкое снижение значения произошло за счет пополнения данных южного Китая последовательностями без вставки (90%). Количество нуклеотидных последовательностей со вставкой немного выше в выборках из центрального и северного Китая (32 и 24% соответственно).

Несмотря на то, что при увеличении выборки за счет данных из генного банка для частичной последовательности ITS1 количество образцов с 5 пн вставкой уменьшилось до 18%, нуклеотидная изменчивость данных последовательностей более чем в 2.5 раза превышает изменчивость в группе последовательностей без вставки (0.00364 ± 0.00242 vs. 0.00137 ± 0.00120). Значения параметров генетической дифференциации между этими группами остались довольно существенными ($D = 0.00290 \pm 0.00122$; $F_{st} = 0.88539$).

3.2.2. Внутривидовые филогенетические отношения частичной последовательности ITS1 рДНК

Для анализа внутривидовых филогенетических отношений с использованием данных по короткому фрагменту ITS1 было построено дерево минимальной протяженности (MST) (рис. 16). При реконструкции данного дерева также были использованы «нулевые» дистанции между риботипами. В данной MST-реконструкции все риботипы разделились на две группы (со вставкой и без вставки). Уникальный риботип из Кронштадтки (Россия) в данном дереве вошел в мажорный риботип, объединяющий 5 «нулевых» риботипов без вставки. Кроме того, этот риботип включил уникальную последовательность из Хабаровска (Россия) с С/G-пиком в 356 позиции.

Мажорный риботип без вставки содержал 68% всех нуклеотидных последовательностей, большую часть которых (93%) составлял риботип,

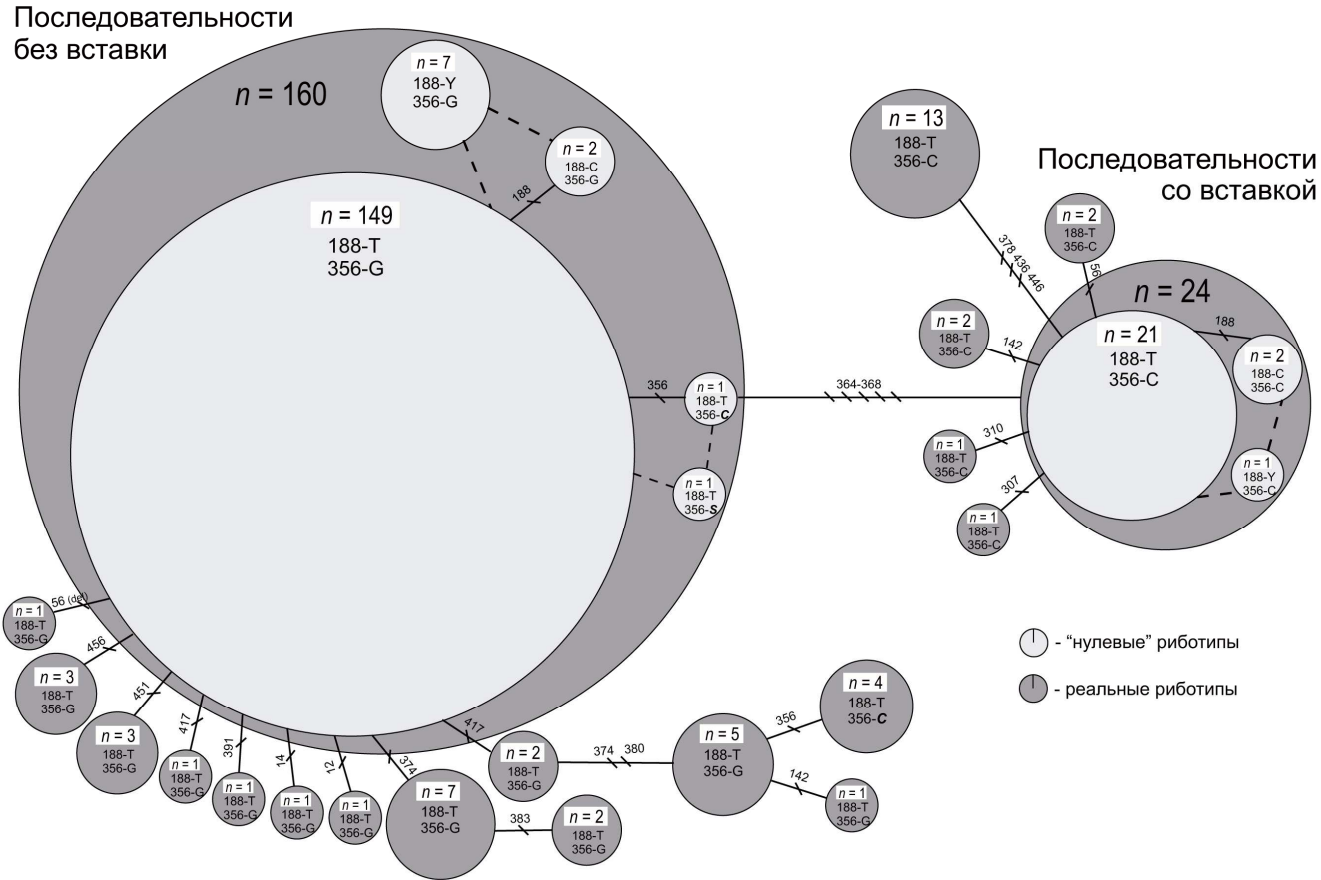


Рис. 16. Дерево минимальной протяженности (MST) для риботипов частичной последовательности участка ITS1 рДНК *C. sinensis*. n – количество образцов в риботипе; количество замен между риботипами отмечено поперечными штрихами, цифрами указаны места локализации нуклеотидных замен; «нулевые» риботипы – риботипы, между которыми нет реальных дистанций (нуклеотидных замен), несмотря на наличие внутригеномного полиморфизма в позициях 188 и 356; Y – внутригеномный полиморфизм C/T; S – внутригеномный полиморфизм C/G; пунктирными линиями отмечены связи между «нулевыми» риботипами

являющийся предковым для всех риботипов группы без вставки. Второй по распространенности риботип включил в себя последовательности со вставкой и составил всего 10% от полной выборки. Данный риботип включил 3 «нулевых» риботипа, один из которых составляет 87.5% и является предковым для всех нуклеотидных вариантов со вставкой. Третий по распространенности риботип (13 образцов) включил в себя образцы из всех географических регионов Китая.

Практически все риботипы второго порядка представлены последовательностями из Китая. Исключение составляют уникальный риботип без вставки, полученный из Кореи, и риботип из России (Хабаровск), включающий две последовательности со вставкой. Все риботипы второго порядка, включающие вставку, по полиморфным сайтам имеют риботип 118-T/356-C. Риботипы второго порядка без вставки в вышеуказанных сайтах представлены риботипом 188-T/356-G, за исключением одного риботипа, включающего 4 нуклеотидные последовательности из Китая.

В полной выборке для частичной последовательности ITS1 выявлено 26 вариантов риботипов (рис. 17), из них 11 – уникальные. Китайская выборка включила в себя наибольшее количество риботипов (19 из 26). В российских популяциях обнаружено только 6 риботипов, из них 2 содержат локусы с внутригеномным полиморфизмом, то есть являются «нулевыми». Вьетнамская и корейская выборки включают по четыре риботипа. У одного риботипа из Вьетнама выявлен внутригеномный полиморфизм.

Только два риботипа (№ 1 и № 9) обнаружены во всех выборках. Первый представляет 85, 69 и 55% всех нуклеотидных последовательностей для выборок из России, Вьетнама и Китая соответственно. Во всех регионах Китая он представлен с довольно высокой частотой (53, 61 и 52% для северного, центрального и южного Китая соответственно). В выборке из Кореи данный риботип включает в себя только 35% всех нуклеотидных последовательностей. Вторым по распространенности риботип (№ 9) составляет незначительную часть

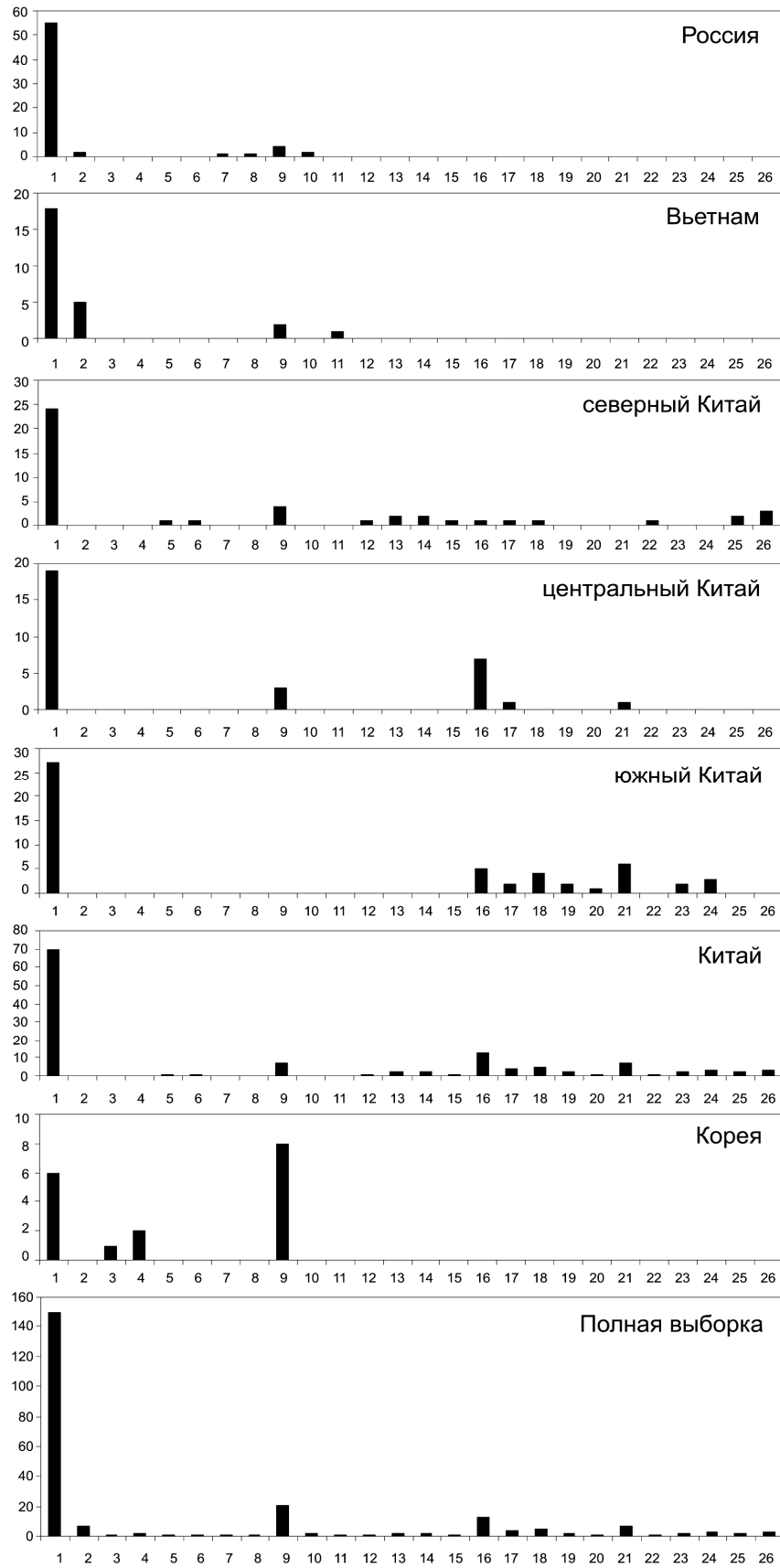


Рис. 17. Частоты риботипов частичной последовательности ITS1 для образцов *C. sinensis*. Ось x – номер риботипа; ось y – количество нуклеотидных последовательностей в риботипе

последовательностей из России, Вьетнама и Китая (6, 7 и 5% соответственно). Примечательно, что риботип № 9 отсутствует в южном Китае. При этом практически половина всех последовательностей (47%) корейской выборки представлена данным риботипом. Также выявлен еще один общий риботип (№ 2) для России и Вьетнама, представляющий в каждой из выборок 3 и 19% нуклеотидных последовательностей соответственно. Остальные 23 риботипа уникальны для каждой страны. В разных регионах Китая риботипы представлены неравномерно. Помимо риботипа № 1 во всех трех регионах обнаружено только 2 общих риботипа (№ 16 и № 17). Выявлен общий для северного и южного Китая риботип № 18, а для центрального и южного Китая – риботип № 21. Остальные 13 риботипов уникальны для каждого географического региона Китая.

3.3. Генетическая изменчивость полноразмерной последовательности гена *cox1* мтДНК

3.3.1. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *cox1*

Для 5 изолятов из России и Вьетнама было получено 65 полноразмерных последовательностей (1560 пн) гена *cox1*. Вместе с образцами из генного банка базы данных NCBI полная выборка составила 68 нуклеотидных последовательностей, представляющих 7 географических локалитетов из России, Вьетнама, Китая и Кореи. Китайские и корейские последовательности оказались идентичными, поэтому данный гаплотип условно обозначен, как «китайско-корейский».

Ген *cox1* является АТ-богатым. Дана оценка АТ/ГС соотношения для всех стран. Для российских и вьетнамских гаплотипов данное значение оказалось идентичным. При этом частоты нуклеотидов С, Т, А и G отличались: 13.46, 42.24, 16.92, 27.38% и 13.45, 42.25, 16.92, 27.38% для России и Вьетнама соответственно. Отношение АТ/ГС было немного меньше для китайско-корейского гаплотипа – 1.43 (13.53, 42.18, 16.73 и 27.56%).

Для полного набора данных для гена *cox1* обнаружено 52 полиморфных сайта, из которых 29 были информативными (рис. 18).

Большая часть мутаций является транзициями ($T_s/T_v = 9.8$). Мутационный профиль представлен 49 транзициями ($C \leftrightarrow T$ или $A \leftrightarrow G$), 5 трансверсиями ($T \leftrightarrow G$, $T \rightarrow A$, $C \rightarrow G$). Вставки и делеции отсутствовали. В исследованных популяциях России и Вьетнама не обнаружены общие трансверсии, а также различия между частотой транзиций. Тем не менее, самые северные популяции в обеих странах (Магдыковое и Тхайбинь) показали преобладание $C \leftrightarrow T$ транзиций, в то время как более южные популяции имели примерно одинаковое количество всех вариантов транзиций. Примечательно, что во всех популяциях $C \rightarrow T$ транзиции находились, главным образом, в 5'-конце, тогда как $T \rightarrow C$ транзиции были в 3'-конце гена *cox1*.

Изучение распределения нуклеотидной изменчивости вдоль гена *cox1* (рис. 19) выявило в его центральной части для образцов из южного Вьетнама (провинция Дананг) наличие довольно протяженного (575 пн) участка, в котором отсутствовала изменчивость. Интересно, что данный консервативный участок уменьшается в размере с юга на север: наиболее короткий инвариантный регион (124 пн) обнаружен для самой северной популяции России (Магдыковое). Помимо этого, первые 400 нуклеотидов на 5'-конце последовательностей гена *cox1* вьетнамской выборки демонстрируют замены, отсутствующие в российских образцах.

Все трансверсии и 83.7% транзиций расположены в третьей позиции кодона, и все они оказались синонимичными. Первая и вторая позиции кодона включили только восемь (16.3% от общего количества) транзиций, из которых 6 являются несинонимичными: две представлены в образцах из России, одна – во вьетнамских образцах, и три обнаружены для китайско-корейского гаплотипа. Эти нуклеотидные замены в позициях 112, 823, 1189, 1313, 1327 и 1399 пн приводят к различным аминокислотным заменам: $Val \rightarrow Met$, $Met \rightarrow Val$, $Thr \rightarrow Ala$, $Ser \rightarrow Leu$, $Phe \rightarrow Leu$ и $Ile \rightarrow Val$ соответственно. Четыре из шести несинонимичных нуклеотидных замен являются единичными и отличаются в каждой стране. Одна информативная несинонимичная нуклеотидная замена, приводящая к аминокислотной замене $Ile \rightarrow Val$, обнаружена в северных

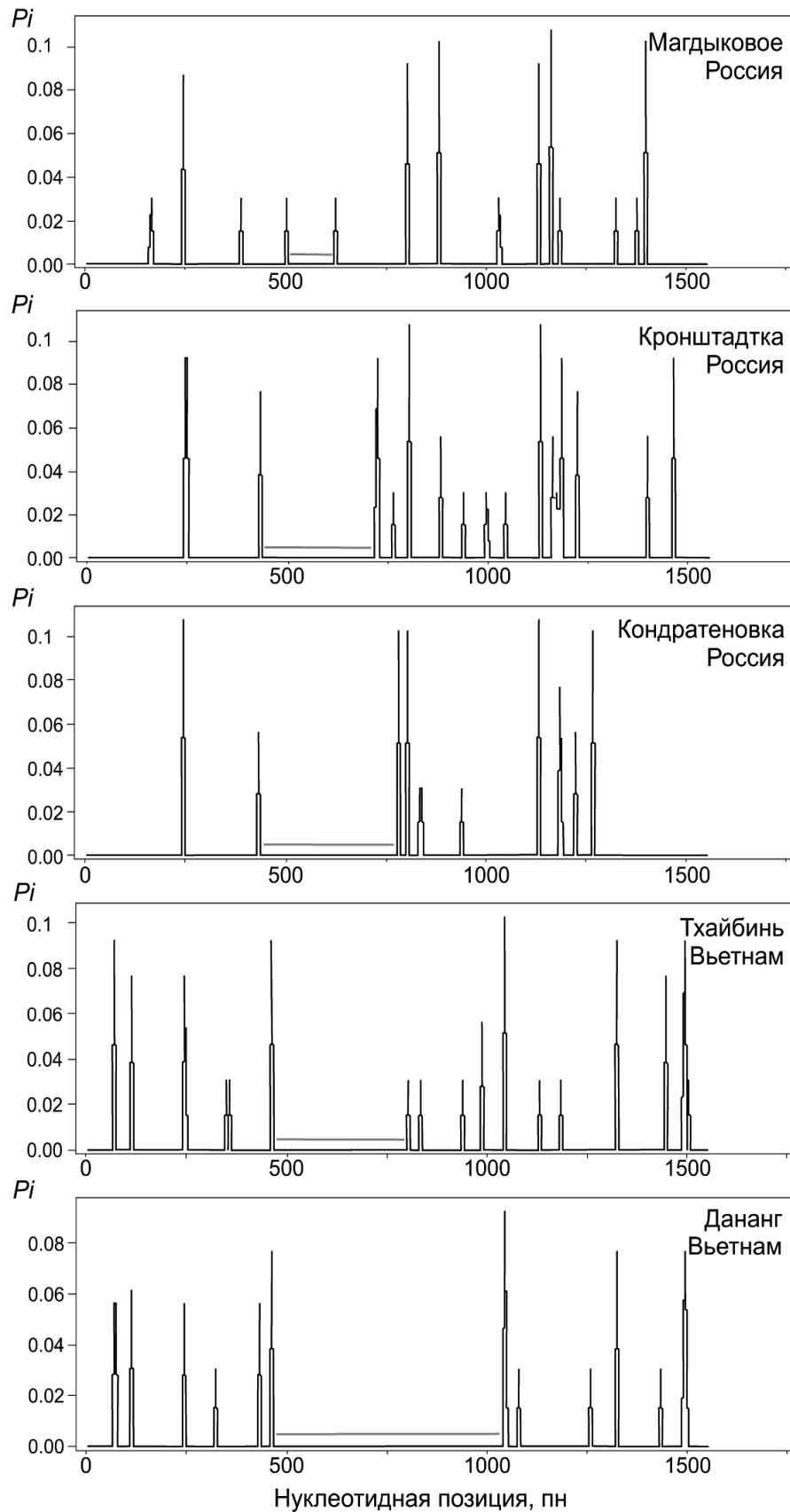


Рис. 19. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в последовательностях гена *cox1* мтДНК *C. sinensis* из различных локалитетов России и Вьетнама. Серые линии показывают консервативный регион в центральной части гена

популяциях России (Магдыковое и Кронштадтка). Вторая, приводящая к аминокислотной замене Val → Met, найдена в обеих вьетнамских популяциях. В данном исследовании фиксированные нуклеотидные и аминокислотные замены не обнаружены.

Наибольшее количество нуклеотидных замен (69%) выявлено в части гена, связанной с α -спиральными участками белка COX1 (рис. 20). При этом только 10 из 52 нуклеотидных замен находятся в функциональных сайтах данного белка. Семь из них соответствуют аминокислотным позициям Val/Met³⁸, Tyr¹¹⁶, Arg²⁰⁸, Ser²⁶¹, Ile³¹³, Ala⁴⁰⁸, Pro⁴⁴¹) в белке COX1 и являются сайтами, отвечающими за взаимодействие поверхностей субъединиц цитохром *c*-оксидазы. Еще два сайта (Ser³⁷⁸, Cys⁴²⁰) обеспечивают химическую связь с гемом *a*, и один сайт (Asp³⁶⁰) вовлечен в образование водного канала. Из всех перечисленных нуклеотидных замен только одна является несинонимичной мутацией, приводящей к смене аминокислоты (Val → Met) в позиции 38. Данная замена обнаружена в обеих популяциях Вьетнама и отсутствует в российской выборке.

Значение частот используемых кодонов сходно во всех исследуемых популяциях. Однако наиболее часто встречающиеся кодоны в обеих странах отличаются: для российских образцов это Ser-кодон, в то время как для вьетнамских образцов это Gly. Самые используемые кодоны (UUU/Phe, GUU/Val, UUG/Leu, GGG/Gly, GGU/Gly, AUG/Met) составляют 32.7% от общего числа кодонов. Один кодон CAA/Gln не был найден ни в одной исследованной популяции.

Для полного набора данных выявлен высокий уровень гаплотипической ($h = 0.976 \pm 0.007$) и относительно низкий уровень нуклеотидной ($\pi = 0.00367 \pm 0.00197$) изменчивости. Подобные значения обнаружены как внутри каждого региона, так и для отдельных локалитетов (табл. 9). Уровень нуклеотидной изменчивости сильно варьирует в каждой популяции. В объединенной выборке из России данное значение немного выше, чем во Вьетнаме (0.00343 ± 0.00188 vs. 0.00292 ± 0.00165). В противоположность этому, значение гаплотипической изменчивости выше для вьетнамских образцов (0.969 ± 0.018 vs. 0.955 ± 0.018).

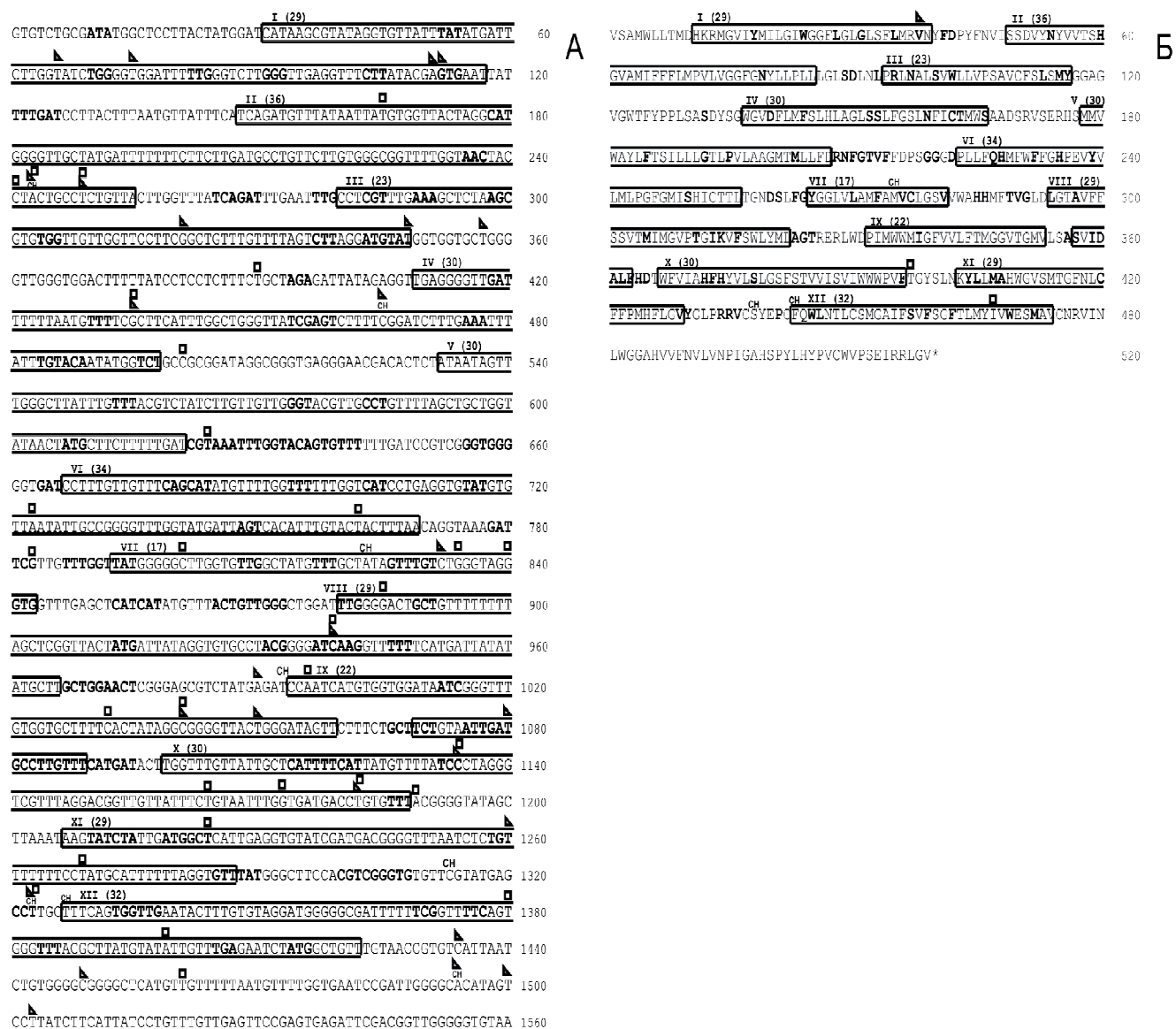


Рис. 20. Функциональные сайты в нуклеотидной последовательности гена *cox1* (A) и предполагаемая аминокислотная последовательность белка COX1 (B) для *C. sinensis*. Схема COX1 для *C. sinensis* основана на трехмерной структуре белка, смоделированной для быка (Tsukihara et al., 1996). Нуклеотиды, выделенные полужирным шрифтом, соответствуют функциональным сайтам белка, полученным из генного банка. α -спиральные участки выделены серыми прямоугольниками; римские и арабские цифры – номера трансмембранных спиралей и количество аминокислотных остатков в спирали соответственно; прямоугольники без номеров – спирали, находящиеся вне мембраны (согласно Tsukihara et al., 1996). Квадраты, треугольники и «CH» – нуклеотидные замены для российских, вьетнамских и китайско-корейских образцов соответственно

Описательная статистика для генетической изменчивости полных последовательностей гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*

Выборка	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	π	<i>k</i>	<i>D</i>
Магдыковое	13	8	15	0.808±0.113	0.00266±0.00159	4.15385±2.20844	0-0.0052 (0.0027)
Кронштадтка	13	9	17	0.910±0.068	0.00370±0.00213	5.76923±2.95257	0-0.0065 (0.0037)
Кондратеновка	13	8	13	0.859±0.089	0,00268±0.00160	4.17949±2.22028	0-0.0058 (0.0027)
Тхайбинь	13	9	18	0.936±0,051	0.00332±0.00193	5.17949±2.68131	0-0.0058 (0.0033)
Дананг	13	9	16	0.936±0.051	0.00255±0.00153	3.97436±2.12548	0-0.0058 (0.0026)
Россия*	40	24	31	0.955±0.018	0.00340±0.00187	5.31026±2.61841	0-0.0065 (0.0034)
Вьетнам	26	18	27	0.969±0.018	0.00292±0.00165	4.54769±2.30995	0-0.0064 (0.0029)
Объединенная выборка**	68	40	52	0.976±0.007	0.00367±0.00197	5.71905±2.77343	0-0.0090 (0.0037)

* – включает собственные нуклеотидные последовательности и образец из генного банка (FJ381664); ** – включает все российские, вьетнамские и китайско-корейские образцы (JF729303, JF729304); *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 (\pm S.D.); *D* – диапазон генетических дистанций, среднее значение указано в скобках.

Анализ генетических дистанций и результатов теста AMOVA не обнаружили значительных отличий между регионами (табл. 10). Генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями варьировали от 0 до 0.90%, со средним значением 0.37% для всей выборки. Уровень отличий между и внутри популяций был немного выше для российских (среднее значение – 0.30 и 0.36% соответственно), чем для вьетнамских (среднее значение – 0.29% в обоих случаях) образцов. Генетические дистанции между географическими регионами немного выше: 0.33-0.44%, со средним значением 0.38%. *Fst*-статистика выявила низкую генетическую подразделенность как между географическими регионами (*Fst* = 0.15448, *P* < 0.0001), так и среди локальных популяций, за исключением

вьетнамских регионов, для которых не обнаружена статистически значимая дифференциация. Точный тест популяционной дифференциации также не показал существенной подразделенности среди локальных популяций и между географическими регионами ($P = 1.0$). Кроме того, между популяциями не обнаружена генетическая изоляция, которая могла образоваться в результате географической удаленности ($P > 0.05$ для всех моделей IBD-анализа).

Таблица 10

Индексы (выше диагонали D и ниже диагонали F_{st}) генетической дифференциации между популяциями *C. sinensis*, вычисленные для полной последовательности гена *cox1* мтДНК

	Выборка	Магдыковое	Кронштадтка	Кондратеновка	Тхайбинь	Дананг
Российские популяции	Магдыковое		0.00386 (0.00096)	0.00346 (0.00090)	0.00390 (0.00094)	0.00340 (0.00084)
	Кронштадтка	0.1755 ($P < 0.01$)		0.00356 (0.00091)	0.00437 (0.00100)	0.00396 (0.00093)
	Кондратеновка	0.2287 ($P < 0.01$)	0.1038 ($P < 0.05$)		0.00378 (0.00094)	0.00333 (0.00087)
Вьетнамские популяции	Тхайбинь	0.2328 ($P < 0.0001$)	0.1976 ($P < 0.0001$)	0.2068 ($P < 0.0001$)		0.00290 (0.00072)
	Дананг	0.2334 ($P < 0.0001$)	0.2106 ($P < 0.0001$)	0.2144 ($P < 0.0001$)	-0.0124 ($P > 0.05$)	

F_{st} – коэффициент генной фиксации (Arlequin); P – уровень достоверности отличий ($P \leq 0.05$ считается существенным); D – генетические дистанции (MEGA), в скобках указано значение стандартной ошибки.

Распределение частот гаплотипов для России и Вьетнама существенно отличается (рис. 21). В полной выборке идентифицировано 40 гаплотипов, из которых большинство (90%) содержали одну или две нуклеотидные последовательности. Количество таких гаплотипов в каждом локалитете варьировало от 66.7% (Кронштадтка, Россия) до 88.9% (Тхайбинь, Вьетнам). Однако в каждой популяции, за исключением Дананга (Вьетнам), обнаружены гаплотипы, включающие в себя от трех до шести копий.

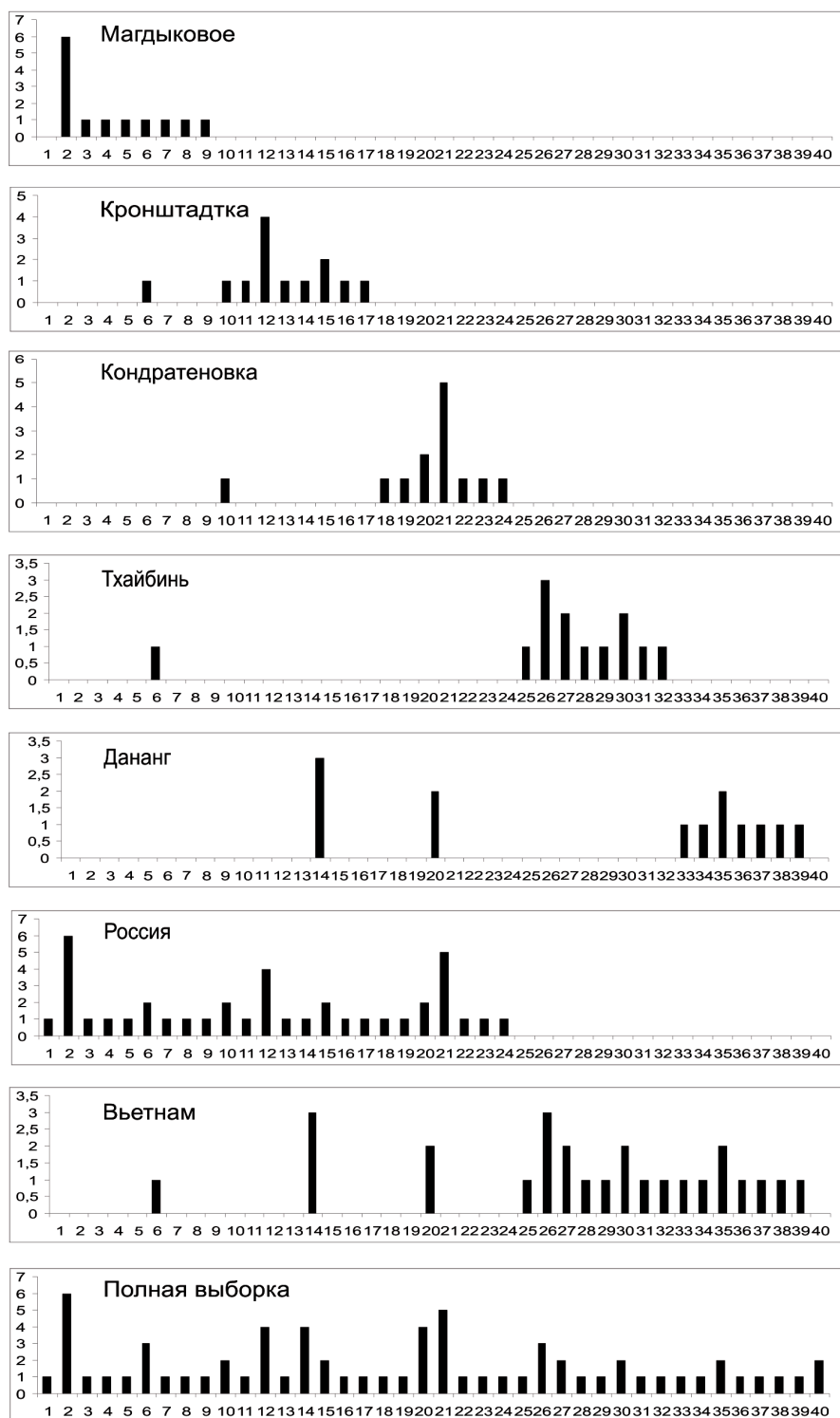


Рис. 21. Частоты гаплотипов гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*. Выборка из России включает в себя последовательности, полученные в данной работе, а также образец из генного банка (FJ381664); полная выборка – все российские, вьетнамские и китайско-корейские (JF729303, JF729304) нуклеотидные последовательности; ось x – номер гаплотипа; ось y – количество нуклеотидных последовательностей в гаплотипе

Гаплотипы гена *cox1* проявляют как локальную, так и региональную специфичность: в каждом попарном сравнении популяций можно выявить не более одного общего гаплотипа, даже в случае анализа выборок из одного региона. Между Россией и Вьетнамом идентифицировано только три общих гаплотипа. Китайско-корейский гаплотип хорошо отличается от всех других гаплотипов.

3.3.2. Анализ внутривидовых филогенетических отношений по данным изменчивости гена *cox1* мтДНК

Для данных по полной последовательности гена *cox1* НКУ-модель нуклеотидных замен (Hasegawa et al., 1985) с пропорцией инвариантных сайтов ($I = 0.6652$) и параметром гамма-распределения ($G = 1.5251$) оказалась наиболее оптимальной для оценки внутривидовых филогенетических отношений. Топологии деревьев NJ, ML и BI в целом были сходны, с небольшими отличиями в значениях бутстреп-поддержки (рис. 22). Однако все эти деревья продемонстрировали неразрешенность внутривидовой филогении. Только несколько кластеров имели статистическую поддержку, которая, тем не менее, не соответствовала географической подразделенности.

Сконструированные на основе наших данных дерево минимальной протяженности (MST) и MJ-сеть гораздо лучше отражают внутривидовую филогению и генеалогические связи между гаплотипами. Реконструкции MST выполняли на основе полной нуклеотидной последовательности гена *cox1*, а также для этого использовали три сегмента гена (1-500, 501-1000 и 1001-1560 пн) (рис. 23). Филогенетический сигнал усиливается для первого, второго и последнего сегментов с 32, 28 и 14 нуклеотидными последовательностями в доминирующем гаплотипе соответственно. Данные гаплотипы могут быть условно обозначены, как «российские», «вьетнамские» и «российско-вьетнамские», так как преимущественно включают образцы из России, Вьетнама или в равной пропорции из обеих стран соответственно. В отличие от филогенетических реконструкций на основе фрагментов гена, MST,

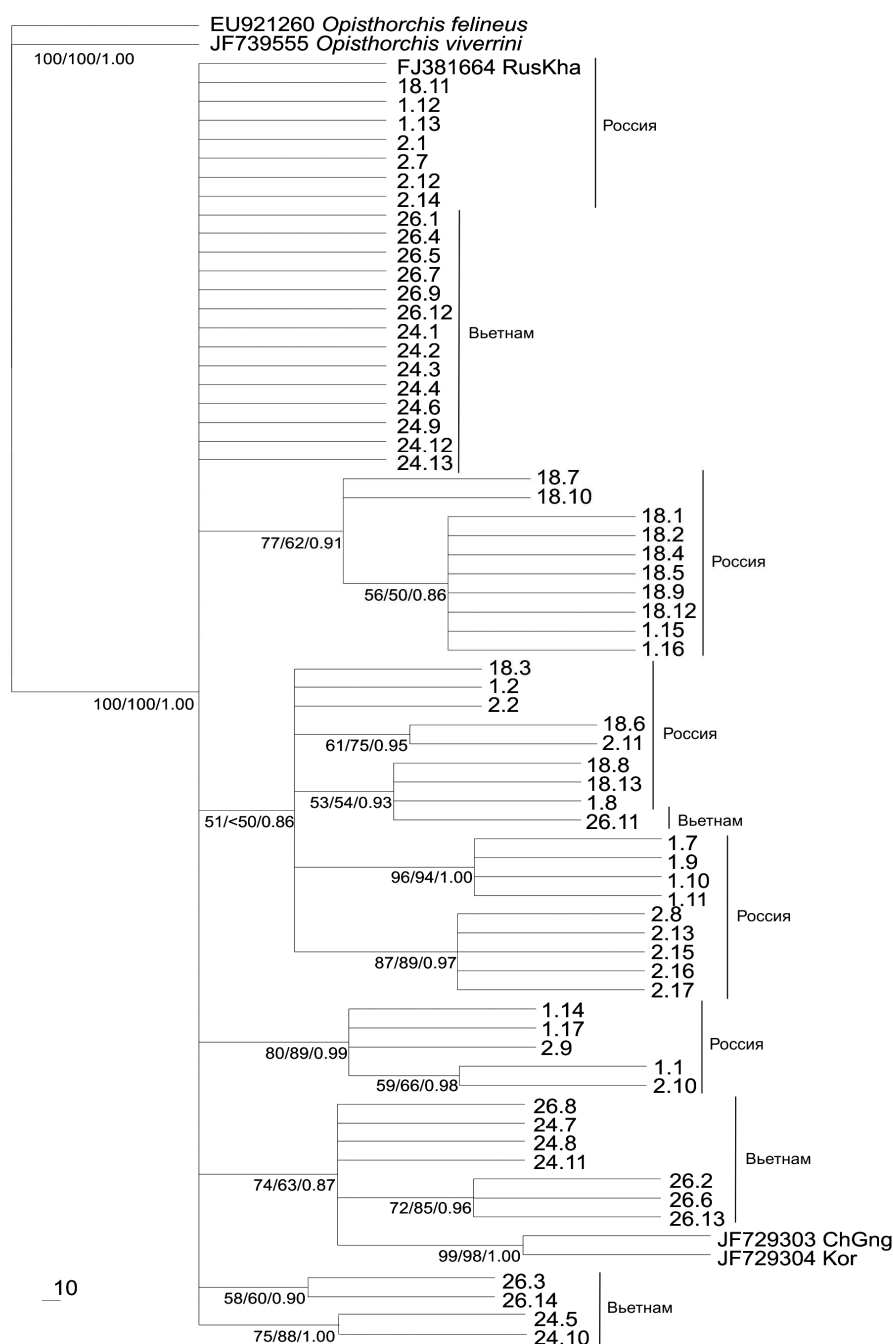


Рис. 22. Филогенетические отношения между изолятами *C. sinensis* на основе полной нуклеотидной последовательности гена *cox1* мтДНК. В узлах ветвей указаны значения бутстреп-поддержки (> 50%) для деревьев ML/NJ/BI соответственно. В качестве внешней группы использованы другие представители надсемейства Opisthorchioidea (*Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini*). 18.1-18.13, 1.1-1.17, 2.1-2.17, 26.1-26.14, 24.1-24.13 – образцы из Магдыковое, Кронштадтки, Кондратеновки, Тхайбиня и Дананга соответственно; RusKha – Россия, Хабаровск; ChGng – Китай, Гуандун; Kor – Корея

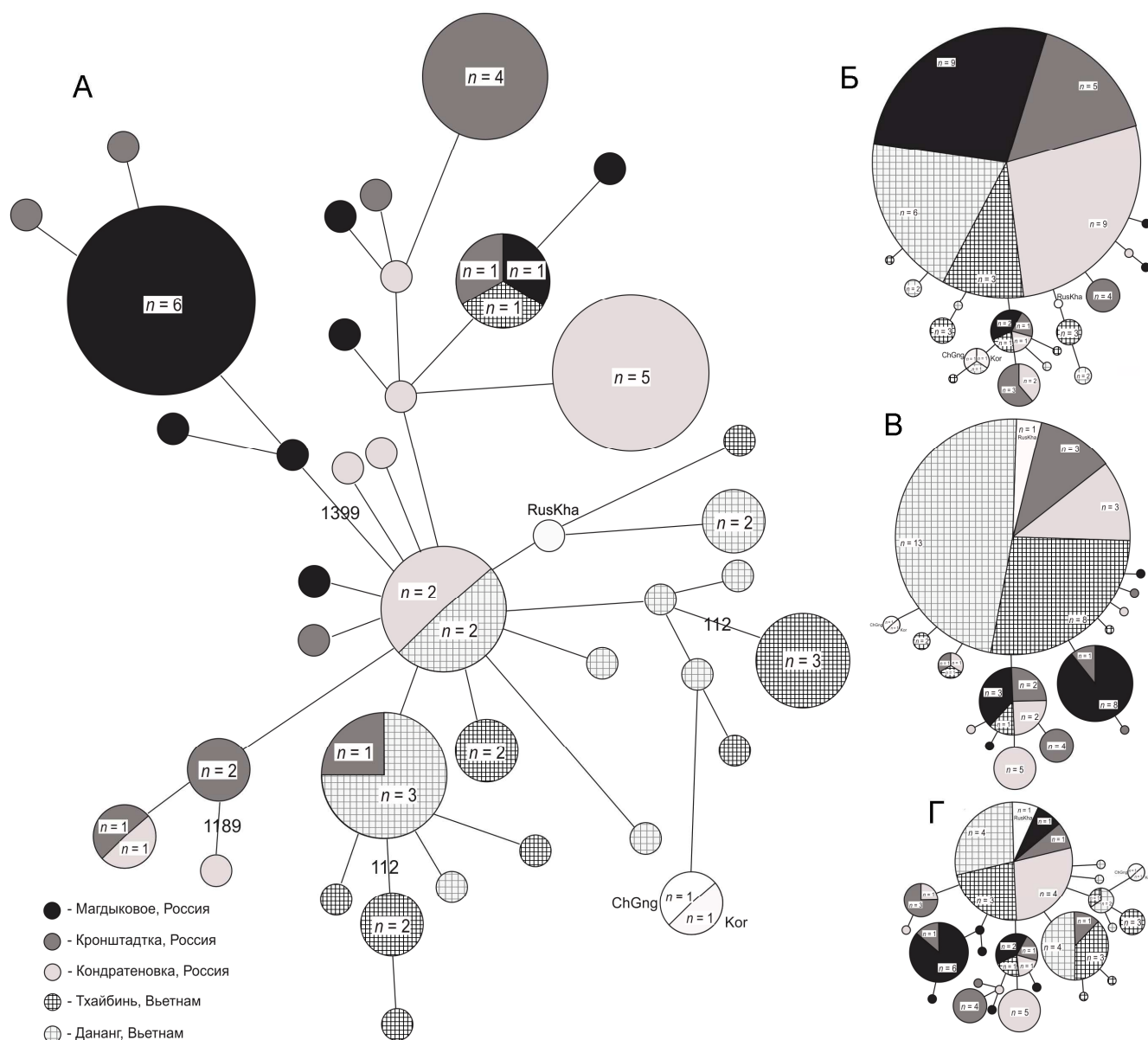


Рис. 23. Дерево минимальной протяженности (MST) для гаплотипов гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*. n – количество образцов в гаплотипе; длина ветвей пропорциональна количеству нуклеотидных замен. А – дерево для полной последовательности гена *cox1* (1560 пн); Б, В, Г – деревья для частичной последовательности (1-500, 501-1000 и 1001-1560 пн соответственно). RusKha – Россия, Хабаровск; ChGng – Китай, Гуандун; Kor – Корея

смоделированное с использованием полной нуклеотидной последовательности, отражает генеалогию более эффективно. Данное дерево имеет сложную относительно компактную топологию со звездообразной структурой в центре. Центральный гаплотип объединяет образцы из России (южная популяция,

Кондратеновка) и Вьетнама (южная провинция Дананг). Структуры второго порядка, главным образом, представлены либо последовательностями из России, либо из Вьетнама. Доминирующий гаплотип каждого российского локалитета хорошо отличается от других (особенно в северной популяции – Магдыковое).

MJ-сеть (рис. 24) для полной последовательности гена соответствует MST и четко выделяет регион-специфичность филогенетических линий.

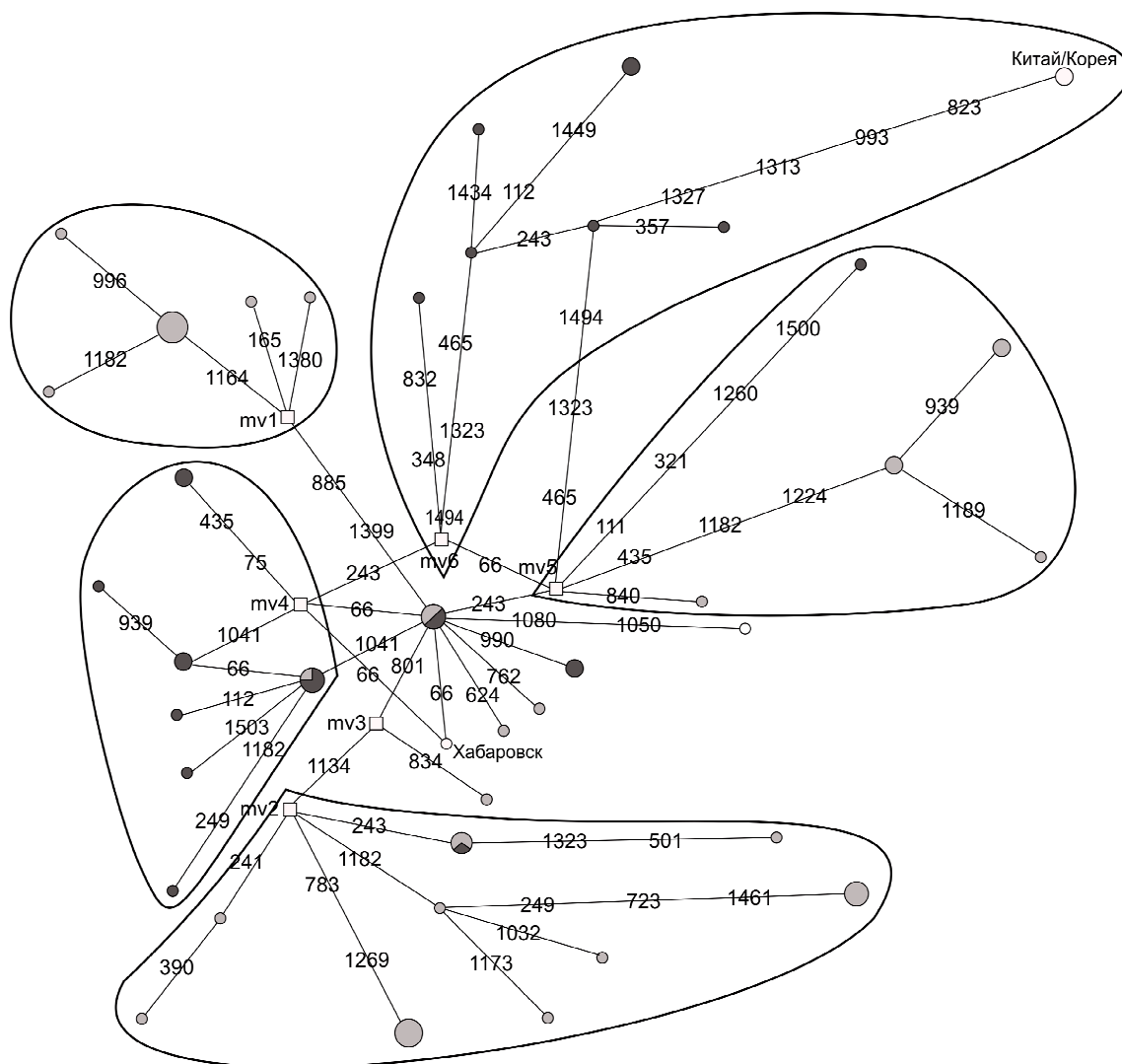


Рис. 24. Медианная сеть для гаплотипов *cox1* мтДНК *C. sinensis*. Светло-серые и темно-серые круги обозначают российские и вьетнамские гаплотипы соответственно; цифрами указаны места локализации нуклеотидных замен; *mv1*-*mv6* – гипотетические гаплотипы, сгенерированные в программе Network ver. 4.6.1.0

Данная реконструкция представлена сложной звездообразной структурой с несколькими короткими лучами вокруг центрального российско-вьетнамского гаплотипа и пятью ветвями, которые включают в себя различные гаплотипы, в том числе гипотетические (mv1-mv6). Последние, согласно медианной сети, являются предковыми для реальных гаплотипов. Кластеризация предполагаемых последовательностей с другими гаплотипами в сети MJ практически полностью соответствует их географическому распределению, за исключением единственной связи между ветвями mv5 и mv6.

На основе генетических дистанций, используя данные по скорости накопления замен в гене *cox1*, определенной для шистосом, было рассчитано, что филогенетические линии начали дивергировать приблизительно 230-130 тысяч лет назад ($d = 0.332-0.577$) и разошлись с предполагаемым общим предком 130-50 тысяч лет назад ($d = 0.128-0.327$).

3.3.3. Историко-демографический анализ популяций *C. sinensis* по данным изменчивости гена *cox1* мтДНК

Для проверки гипотезы популяционной экспансии *C. sinensis* проанализировано распределение попарных нуклеотидных отличий между гаплотипами. Графики распределения попарных генетических различий были получены для каждой популяции, географического региона и для полной выборки (рис. 25). Структура распределения попарных генетических различий указывает на более высокую генетическую гетерогенность последовательностей гена *cox1* для российских популяций, особенно для выборки из Магдыковое, со статистически подтвержденным отклонением от унимодального распределения. Локальные популяции Вьетнама более гомогенны, со статистически подтвержденным унимодальным распределением для популяции из Дананга. Распределение попарных генетических различий, как для географических регионов, так и для полной выборки показывает практически полное совпадение с ожидаемым унимодальным распределением согласно модели, предполагающей экспансию популяции (Rogers, 1995). Пики во всех графиках распределения

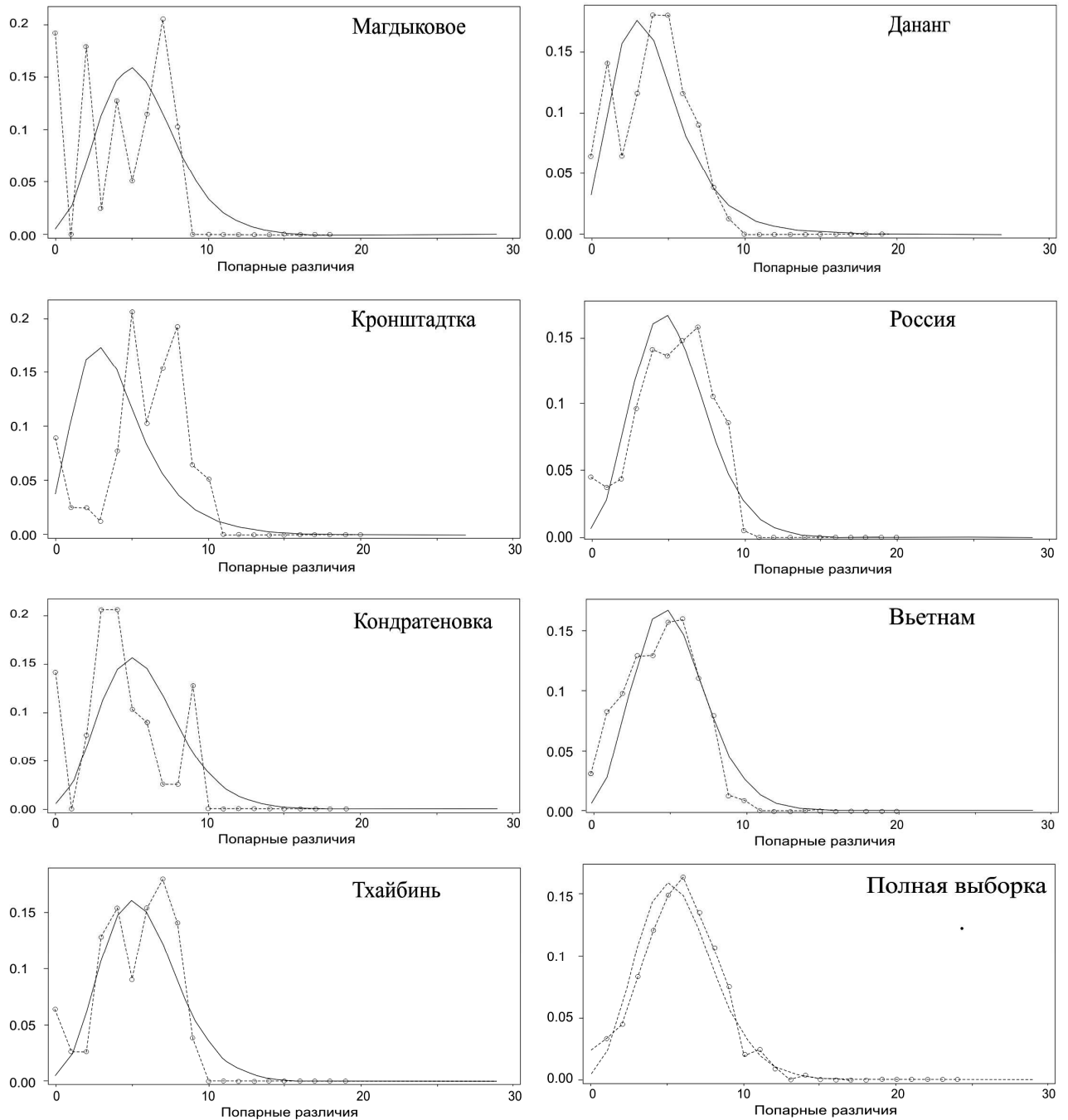


Рис. 25. Графики распределения попарных генетических различий для гаплотипов гена *cox1* мтДНК *C. sinensis* из различных локалитетов, географических регионов и для полной выборки. Сплошная и пунктирная линии – ожидаемое и наблюдаемое распределение соответственно. Выборка из России включает в себя последовательности, полученные в данной работе, а также образец из генного банка (FJ381664); полная выборка – все российские, вьетнамские и китайско-корейские (JF729303, JF729304) нуклеотидные последовательности

находятся в диапазоне 5-6, что исключает вероятность прохождения исследуемых выборок через генетическое бутылочное горлышко в недавнем прошлом.

Для полной выборки значения дистанций Таджимы D (-1.57, $P = 0.03$) и теста Фу F_s (-25.48, $P = 0.00$) были отрицательными и статистически значимыми. Для географических регионов был значимым только критерий Фу F_s (< -25.00 , $P = 0.00$). Показатель τ для полной выборки имел значение 6.17 (3.25-8.16). Абсолютное время экспансии (t) датирует последнюю экспансию популяции приблизительно 40 тысяч лет назад (21-53 тысяч лет назад). Сходные результаты получены для обоих регионов. Однако демографический рост для российских образцов был выше (отношение θ_1/θ_0 в 6 раз выше, чем для образцов из Вьетнама) (табл. 11).

3.4. Генетическая изменчивость частичной последовательности гена *cox1* мтДНК

3.4.1. Анализ частичных нуклеотидных последовательностей гена *cox1*

Для привлечения дополнительных данных из генного банка проанализирована частичная последовательность гена *cox1* мтДНК. Длина короткого фрагмента *cox1* составила 324 пн (позиции 739-1062 пн полной последовательности). Полная выборка составила 107 нуклеотидных последовательностей из 14 локалитетов России, Японии, Китая, Кореи и Вьетнама. Для всего набора данных по короткой последовательности гена *cox1* уровень полиморфизма достигает 7.1%. Из 23 полиморфных сайтов 15 являются информативными. Большая часть мутаций представлена транзициями ($T_s/T_v = 4.75$). Мутационный профиль представлен 19 транзициями ($C \leftrightarrow T$ или $A \leftrightarrow G$) и 4 трансверсиями ($A \rightarrow C$, $T \leftrightarrow G$), без вставок и делеций. Большая часть транзиций располагается в третьей позиции кодона, и все они являются синонимичными мутациями. Несинонимичные замены, найденные в первой и второй позиции кодона, выявлены для четырех последовательностей (один корейский и три китайских образца). Эти нуклеотидные замены в позициях 85, 172, 176 и 193 являются причиной замены аминокислот $Met \rightarrow Val$, $Met \rightarrow Ser$ и в двух случаях

Индексы генетической дифференциации D и F_s , их P -уровни
и демографические параметры, вычисленные для гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*

Выборка	Критерий Таджимы D		Критерий теста Фу F_s		Демографические параметры			Статистические критерии согласия			
	D	P	F_s	P	τ	θ_0	θ_1	SSD	P	HRI	P
Магдыковое	-0.58747	0.29500	-10.60309	0.00000	7.43359	0.00000	9.32617	0.04627	0.25000	0.14250	0.21000
Кронштадтка	0.22437	0.63200	-8.54166	0.00000	7.04297	0.00000	50.45288	0.02237	0.25000	0.05868	0.28000
Кондратеновка	-0.00956	0.54700	-10.56184	0.00000	3.80078	1.06172	15.35156	0.03523	0.20000	0.08399	0.23000
Тхайбинь	-0.45425	0.37300	-9.18656	0.00000	6.31445	0.00703	37.77344	0.01332	0.41000	0.03501	0.51000
Дананг	-0.96284	0.17700	-10.90211	0.00000	5.08594	0.00000	14.16016	0.00843	0.81000	0.02679	0.86000
Россия	-0.93655	0.19500	-25.44799	0.00000	6.17383	0.00352	41.09375	0.00357	0.45000	0.01482	0.64000
Вьетнам	-1.31549	0.08100	-25.69771	0.00000	5.35352	0.01230	23.32275	0.00327	0.83000	0.01274	0.96000
Полная выборка	-1.57455	0.03100	-25.32885	0.00000	6.17188	0.00703	63.08594	0.00097	0.63000	0.01026	0.63000

τ – временной коэффициент популяционной экспансии; θ_0 , θ_1 – мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности популяции соответственно; SSD – среднеквадратическое отклонение; HRI – индекс шероховатости Харпендинга; выборка из России включает в себя последовательности, полученные в данной работе, а также образец из генного банка (FJ381664); полная выборка – все российские, вьетнамские и китайско-корейские (JF729303, JF729304) нуклеотидные последовательности.

Thr → Pro. В общей выборке не обнаружены общие для разных стран трансверсии.

Распределение нуклеотидной изменчивости вдоль короткого фрагмента гена *cox1* отличается для выборок из разных стран (рис. 26). В российских образцах нуклеотидные замены преимущественно расположены в 5'-конце анализируемого участка, тогда как большинство замен для вьетнамских последовательностей обнаружено в 3'-конце. При этом в первых 200 нуклеотидах данного фрагмента для образцов из Вьетнама практически отсутствуют нуклеотидные замены (всего два полиморфных сайта). В китайской выборке изменчивость распределена более равномерно вдоль всего фрагмента гена *cox1*.

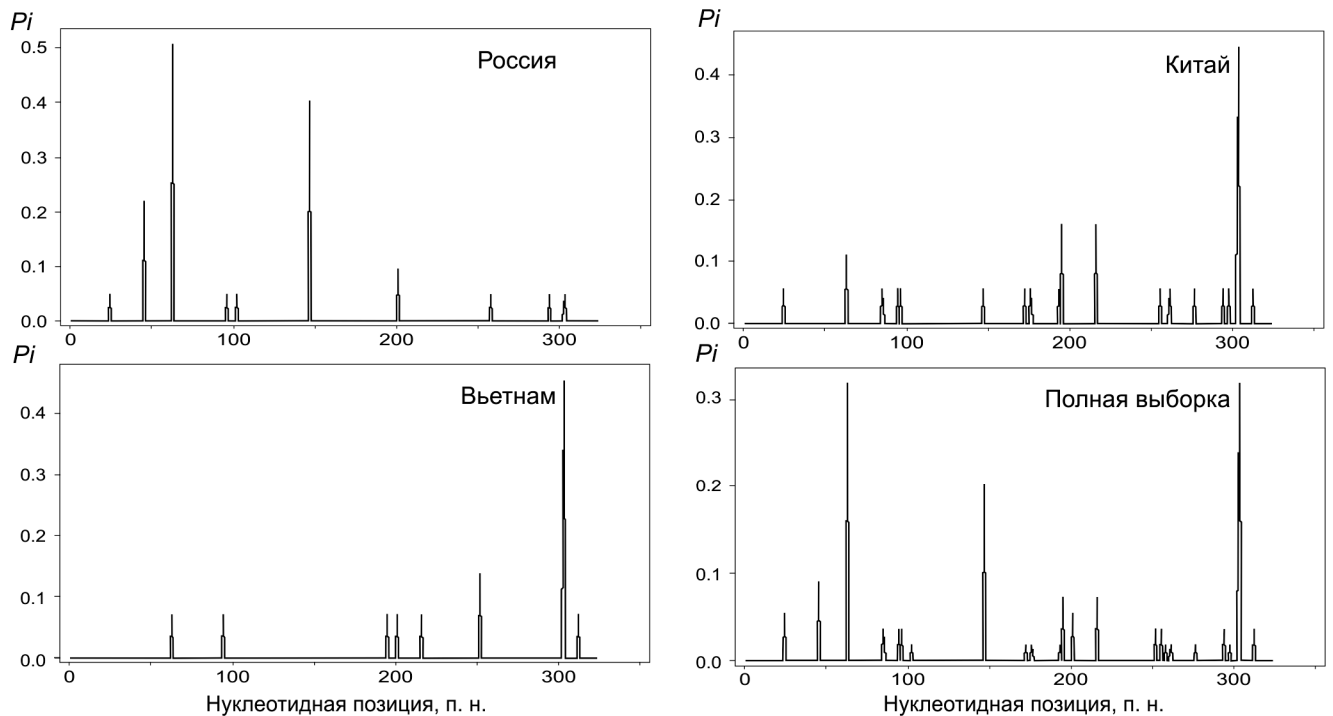


Рис. 26. Распределение нуклеотидных замен (P_i) в частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *C. sinensis* из России, Вьетнама и Китая

Значения индексов генетической изменчивости для образцов из России, Вьетнама, Китая и для полной выборки указаны в таблице 12. Степень дивергенции между гаплотипами варьировала от 0 до 1.88%, со средним значением 0.5% для всего вида. Количество полиморфных сайтов выше для

китайских образцов по сравнению с российскими и вьетнамскими образцами (18, 10 и 8 соответственно). Генетические дистанции между наиболее дивергировавшими гаплотипами и средние генетические дистанции для образцов из России и Вьетнама гораздо ниже значений вышеуказанного параметра для китайских образцов. Для полной выборки обнаружено высокое значение гаплотипического разнообразия ($h = 0.850 \pm 0.025$) и относительно низкое значение нуклеотидной изменчивости ($\pi = 0.00491 \pm 0.00039$). Кроме того, все параметры генетической изменчивости для Вьетнама были немного ниже, чем для России и Китая. Вероятно, это связано с меньшим размером выборки из Вьетнама. Однако, несмотря на большое количество образцов, значение параметров генетической изменчивости для российской выборки также небольшое.

Таблица 12

Описательная статистика для генетической изменчивости
частичных последовательностей гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*

Выборка	n	H	S	h	π	k	D
Россия	41	11	10	0.839 ± 0.031	0.00467 ± 0.00039	1.51463 ± 0.92969	0-0.0126 (0.0047)
Вьетнам	28	8	8	0.717 ± 0.067	0.00314 ± 0.00056	1.01851 ± 0.70332	0-0.0125 (0.0032)
Китай	35	16	18	0.820 ± 0.058	0.00518 ± 0.00081	1.67731 ± 1.00793	0-0.0188 (0.0052)
Объединенная выборка*	107	25	23	0.850 ± 0.025	0.00491 ± 0.00039	1.59196 ± 0.95331	0-0.0188 (0.0050)

* – включает собственные нуклеотидные последовательности, а также российские, вьетнамские, китайские, корейские и японские образцы из генного банка; 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 (\pm S.D.); D – диапазон генетических дистанций, среднее значение указано в скобках.

Как генетические дистанции, так и анализ AMOVA, включая частоту гаплотипов и расхождение в нуклеотидных последовательностях между

гаплотипами групп, при сравнении не выявили сильных отличий между регионами (табл. 13). Точный тест популяционной дифференциации также не показал существенных различий между популяциями ($P = 1.00$). По этой причине нельзя отклонить нуль-гипотезу, предполагающую, что популяция *C. sinensis* является панмиктической. Помимо этого, с помощью теста Мантеля ($P > 0.05$ для всех моделей IBD-анализа) не обнаружена генетическая изоляция между популяциями, то есть географические дистанции не служат барьером для генных потоков.

Таблица 13

Индексы генетической дифференциации между образцами
C. sinensis из различных регионов, вычисленные для частичной
последовательности гена *cox1* мтДНК

Попарное сравнение	F_{st} (P)	D (\pm S.D.)
Россия/Вьетнам	0.19159 ($P < 0.0001$)	0.00494 (0.00192)
Россия/Китай	0.15277 ($P < 0.0001$)	0.00589 (0.00196)
Вьетнам/Китай	-0.01670 ($P < 0.05$)	0.00415 (0.00143)

F_{st} – коэффициент генной фиксации (Arlequin); P – уровень достоверности отличий ($P \leq 0.05$ считается существенным); D – генетические дистанции (MEGA), в скобках указано значение стандартной ошибки.

Распределение частот гаплотипов представлено на рисунке 27. Среди 25 идентифицированных гаплотипов более половины (56%) являются уникальными, то есть представлены одним образцом. Общий гаплотип, включающий почти 33% всех образцов, был найден во всех регионах, за исключением Кореи. Гаплотипический состав выборок из разных стран существенно отличается. Так для России и Китая обнаружено только 5 общих гаплотипов. Столько же общих гаплотипов выявлено для Вьетнама и Китая. Между Россией и Вьетнамом есть только три общих гаплотипа.

Из 25 гаплотипов 11 обнаружено в российской выборке. Из них 4 представлено единственной последовательностью. Данные гаплотипы являются

уникальными для России. Большая часть нуклеотидных последовательностей (33 из 41, то есть 80%) представлена четырьмя гаплотипами: один специфичен для России, другой – общий с северным Китаем, третий, помимо России, найден в северном Китае и в северном Вьетнаме, а четвертый также обнаружен в Японии, в южной части Китая и во Вьетнаме.

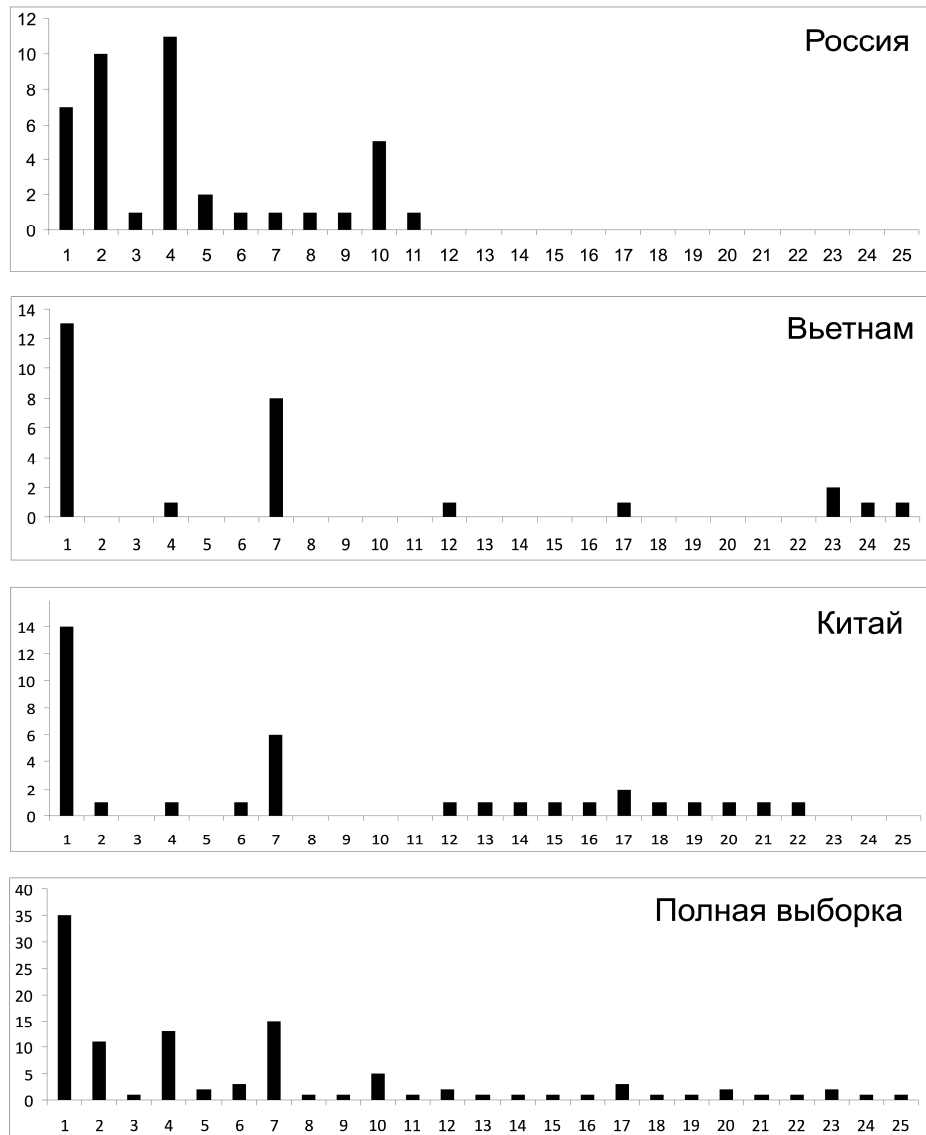


Рис. 27. Частоты гаплотипов частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *S. sinensis* из различных регионов. Полная выборка включает все российские, вьетнамские, китайские, корейские и японские нуклеотидные последовательности, полученные в данной работе, а также образцы из генного банка; ось x – номер гаплотипа; ось y – количество нуклеотидных последовательностей в гаплотипе

Во Вьетнаме разнообразие гаплотипов меньше. В нашем исследовании идентифицировано только 8 вьетнамских гаплотипов, из которых три представлены одной нуклеотидной последовательностью. Большая часть последовательностей (21 из 28, то есть 75%) представлена двумя гаплотипами: первый – общий с Россией и южным Вьетнамом, второй обнаружен в Японии, в южной части Китая и во Вьетнаме.

Китайская выборка включает 16 гаплотипов. Больше половины последовательностей (20 из 35, то есть 57%) представлено двумя самыми распространенными гаплотипами. В китайской выборке обнаружено 8 гаплотипов, включающих по одной последовательности.

Корейские образцы представлены 2 гаплотипами, один из которых включает особь из южного Китая, а второй – последовательности из южного Китая и России.

3.4.2. Внутривидовая филогения и филогеография *C. sinensis* по данным изменчивости фрагмента гена *cox1* мтДНК

Для оценки филогенетических отношений между образцами на основе частичной последовательности гена *cox1* использовали дерево минимальной протяженности (MST) (рис. 28).

Данная реконструкция имеет достаточно простую звездообразную структуру с одним предковым гаплотипом и двумя небольшими ответвлениями. Одна ветвь включает в себя преимущественно российские гаплотипы, а также один образец из Вьетнама и один – из северного Китая. Другая объединила гаплотипы из Вьетнама, южного Китая и один образец из России. Географическая подразделенность в данной реконструкции отсутствует.

Как и в случае с полной последовательностью гена *cox1*, MJ-сеть для короткого фрагмента (рис. 29) соответствует MST. Однако гипотетические гаплотипы отсутствуют. При этом данная реконструкция образует дополнительные связи, которые отражают нуклеотидные замены в позициях 63 и 303 пн частичной последовательности гена.

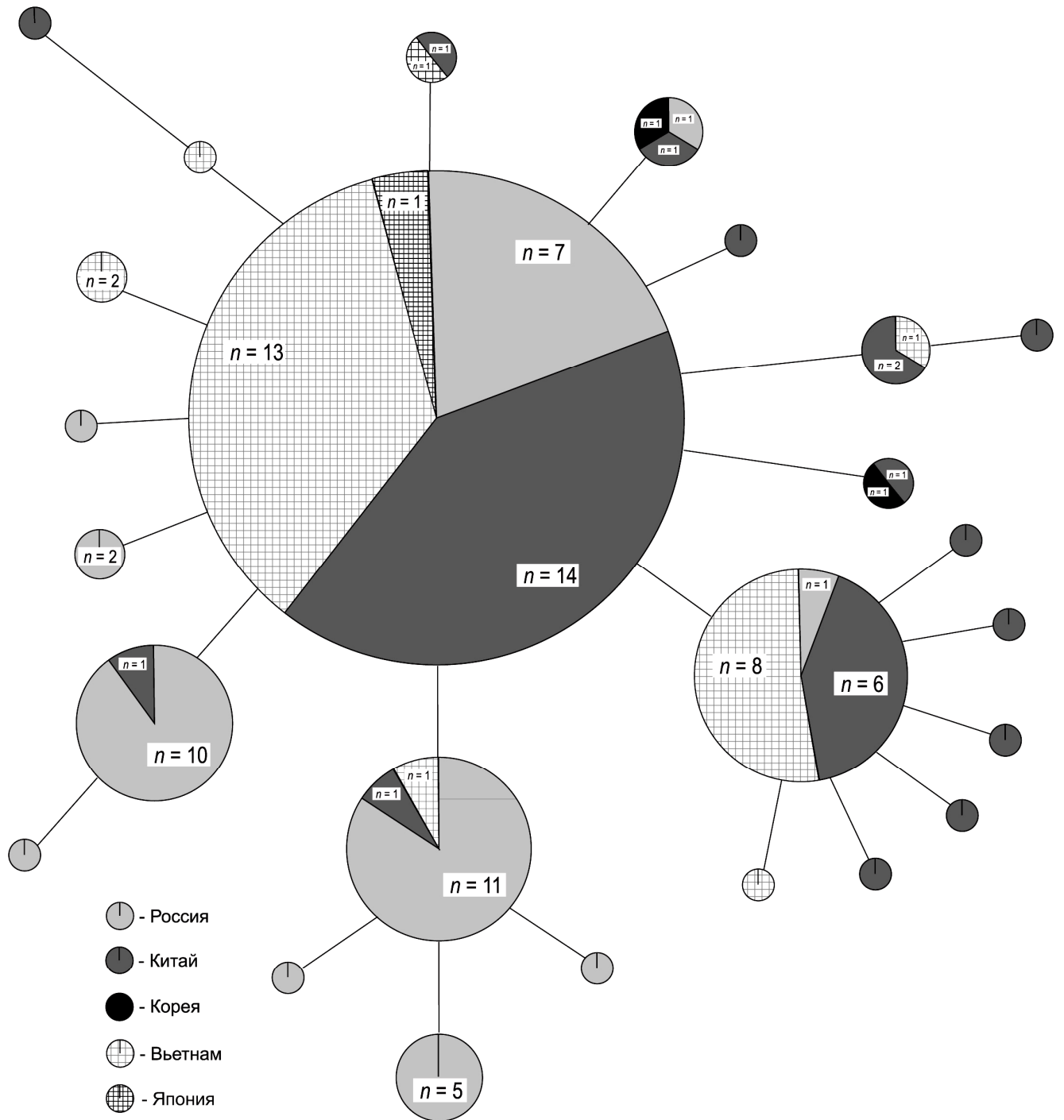


Рис. 28. Дерево минимальной протяженности (MST) для гаплотипов частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*. n – количество образцов в гаплотипе; длина ветвей пропорциональна количеству нуклеотидных замен

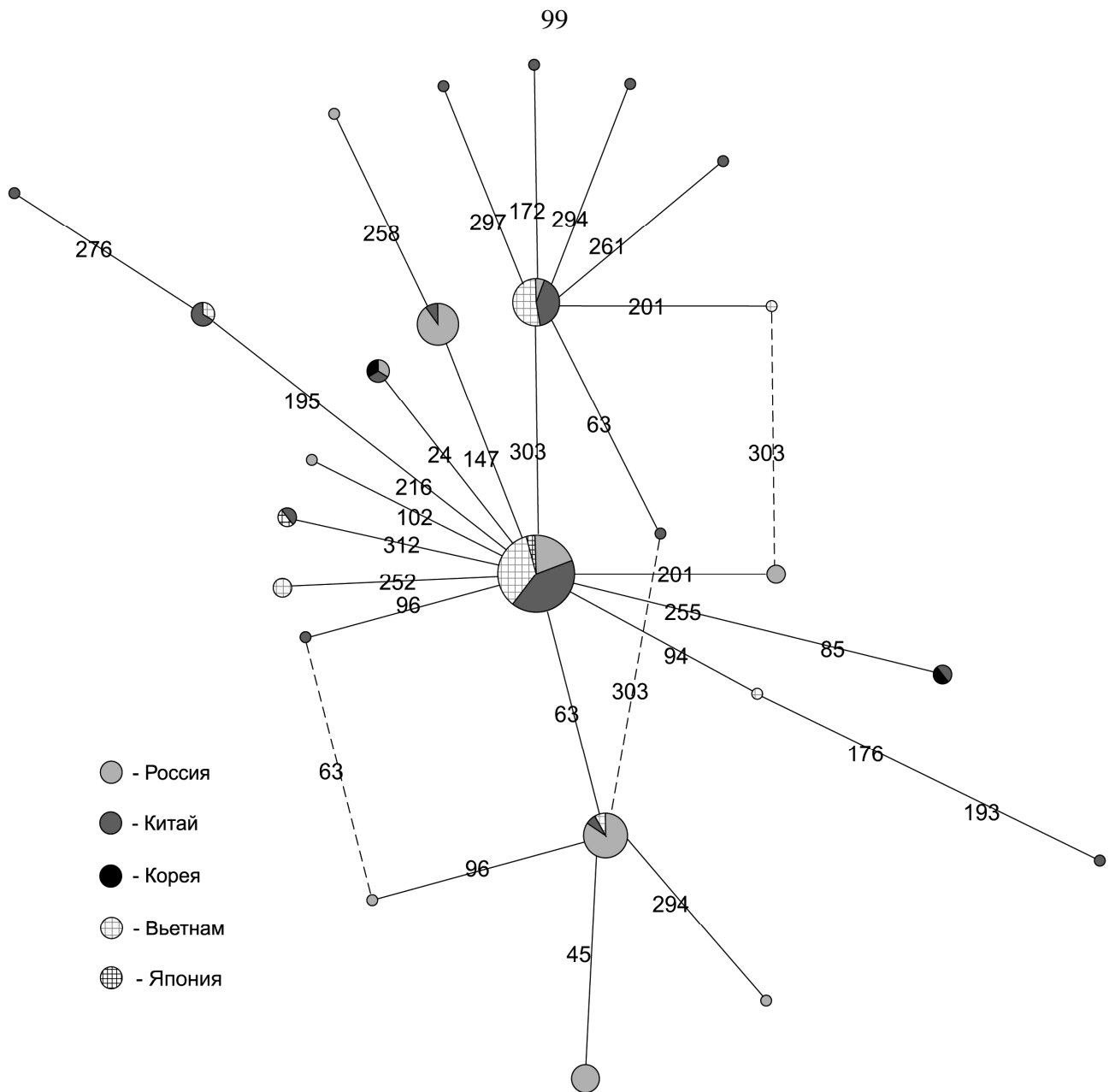


Рис. 29. Медианная сеть гаплотипов для частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*, генерированная в программе Network ver. 4.6.1.0. Цифрами указаны места локализации нуклеотидных замен; дополнительные связи отмечены пунктирной линией

3.4.3. Историко-демографический анализ популяций *C. sinensis* по данным изменчивости частичных последовательностей гена *cox1* мтДНК

Анализ демографической истории *C. sinensis* на основе данных частичной последовательности гена *cox1* проводили с использованием графиков распределения попарных генетических отличий, полученных для географических регионов и для всей выборки в целом (рис. 30). На всех графиках унимодальное

наблюдаемое распределение попарных генетических различий соответствовало ожидаемому распределению согласно модели популяционной экспансии. Пики всех графиков находятся в диапазоне 0-1 (L-образная кривая), что говорит о вероятности прохождения популяций в недавнем прошлом через генетическое бутылочное горлышко.

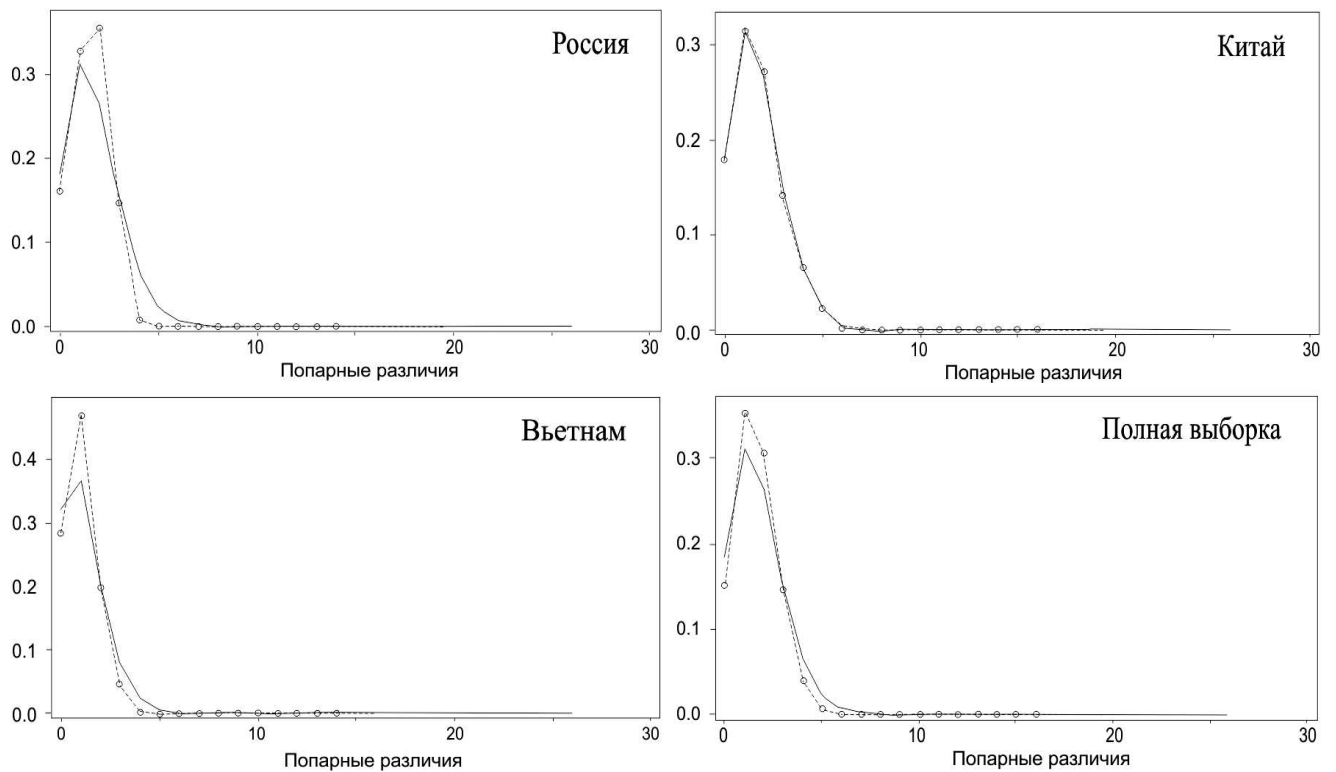


Рис. 30. Графики распределения попарных генетических различий для гаплотипов частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *C. sinensis* из различных географических регионов и для полной выборки. Сплошная и пунктирная линии – ожидаемое и наблюдаемое распределение соответственно

Дистанции Таджимы D (-1.86 , $P = 0.01$) и теста Фу F_s (-28.00 , $P = 0.00$) – отрицательные и статистически значимые для полной выборки. Такие значения типичны для популяций с относительно недавней демографической экспансией. Для всех географических регионов, кроме России, значимыми также являются оба критерия. Дистанции Таджимы D для российской выборки оказались статистически не значимы. Однако значения индексов шероховатости

Харпендинга ($HRI = 0.005$, $P = 0.064$) и среднеквадратического отклонения ($SSD = 0.081$, $P = 0.029$) свидетельствуют об отклонении от модели популяционной экспансии.

Согласно данным изменчивости частичной последовательности гена *cox1* значение τ для полной выборки равно 1.69 (0.89-2.04). Абсолютное время экспансии (t) для исследуемой популяции – приблизительно 11 тысяч лет назад (6-13 тысяч лет назад), то есть данные показатели гораздо ниже значений, полученных для полной последовательности гена. Для выборок из России и Китая были получены сходные результаты. Однако экспансия вьетнамских образцов по полученным данным произошла всего 7 тысяч лет назад (4-14 тысяч лет назад) (табл. 14).

Индексы генетической дифференциации D и F_s , их P -уровни
и демографические параметры, вычисленные для частичной последовательности гена *cox1* мтДНК *C. sinensis*

Выборка	Критерий Таджимы D		Критерий теста Фу F_s		Демографические параметры			Статистические критерии согласия			
	D	P	F_s	P	τ	θ_0	θ_1	SSD	P	HRI	P
Россия	-1.04463	0.17100	-27.75928	0.00000	1.71094	0.00000	99999.00	0.01206	0.11000	0.09101	0.14000
Вьетнам	-1.55795	0.04300	-30.79400	0.00000	1.14258	0.00000	99999.00	0.01356	0.18000	0.13188	0.08000
Китай	-2.06128	0.00600	-27.44083	0.00000	1.69531	0.00000	99999.00	0.00016	1.00000	0.04481	0.59000
Полная выборка	-1.86389	0.00700	-27.99855	0.00000	1.69336	0.00000	99999.00	0.00532	0.06400	0.08060	0.02900

τ – временной коэффициент популяционной экспансии; θ_0, θ_1 – мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности популяции соответственно; SSD – среднеквадратическое отклонение; HRI – индекс шероховатости Харпендинга.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Генетическая изменчивость ядерного маркера ITS1-5.8S-ITS2 рДНК

Внутривидовая изменчивость внутренних транскрибируемых спейсеров трематод имеет невысокое значения (Hashimoto et al., 1997; Park, 2007). Исследования генетической изменчивости нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 рДНК *C. sinensis* из Кореи и Китая показало их высокое сходство (Park, York, 2001; Lee, Huh, 2004; Park, 2007).

Участок ITS2 рДНК является достаточно чувствительным маркером для анализа изменчивости на видовом уровне (Morgan, Blair, 1995; van Herwerden et al., 1999). До настоящего исследования в последовательностях участка ITS2 рДНК *C. sinensis* не удавалось выявить генетическую изменчивость, даже при сравнении с древними образцами (Liu et al., 2007). В нашей работе подтверждено отсутствие внутривидовой изменчивости для ITS2 *C. sinensis* на межиндивидуальном уровне. Вместе с тем, нами впервые выявлен внутригеномный полиморфизм в позиции 145 пн для последовательности ITS2 из Вьетнама. Низкий уровень внутривидовой изменчивости участка ITS2 также обнаружен для близкого вида – *Opisthorchis viverrini* (Ando et al., 2001; Park, 2007).

Использование данных о вторичной структуре ITS1 и ITS2 позволяет провести филогенетический анализ, который отражает наиболее реалистичную картину межвидовых отношений в различных группах животных. Также такие модели могут быть ценным инструментом для выделения новых видов (Subbotin et al., 2007; Prasad et al., 2009). В данной работе были впервые получены модели вторичной структуры транскриптов ITS1 и ITS2 *C. sinensis*, а также модели для ITS2 других представителей семейства Opisthorchiidae.

Вторичная структура участка ITS2 у большинства организмов состоит из 4 спиралей, расположенных вокруг консервативного центрального участка (Morgan, Blair, 1998; Coleman, 2003; Ma et al., 2008). Полученная нами структура ITS2 для *C. sinensis* продемонстрировала высокое сходство со структурами других представителей описторхид: *Metorchis orientalis* (HM347226), *Opisthorchis*

viverrini (AY584735) и *O. felineus* (EF688142). Такой консерватизм должен поддерживаться естественным отбором, что подразумевает высокую функциональную значимость первичной и вторичной структур этого некодирующего региона рДНК. Основные межвидовые отличия обнаружены в верхушках спиралей вторичной структуры ITS2, и, вероятно, мутации в данных участках могут оказывать влияние на адаптивную способность вида. Хотя биологическая роль спейсера ITS2 не совсем понятна, показано предотвращение образования рибосом при некоторых изменениях во вторичной структуре данного фрагмента рРНК, что свидетельствует о значении этого спейсерного участка в производстве зрелой рРНК и сборке рибосом (Coté, Peculis, 2001).

Существует очень мало информации и о вторичной структуре ITS1. Для большинства эукариот эти структуры состоят из открытой петли с множественными разветвлениями и несколькими спиральями (Gottschling, Plötner, 2004; Wang et al., 2007). По нашим данным вторичная структура ITS1 для китайской печеночной двуустки представляет собой две сложно организованные ветви, отделенные друг от друга длинным двуспиральным участком.

ITS1 трематод при меньших функциональных ограничениях, как правило, проявляет большую степень изменчивости, как в длине фрагмента, так и в последовательности нуклеотидов (Köhler et al., 2006). Количество нуклеотидных замен варьирует вдоль спейсера ITS1. В участке ITS1 *C. sinensis* обнаружен более консервативный 3'-конец, что указывает на высокую функциональную значимость данного фрагмента (van Herwerden et al., 1998; van Herwerden et al., 1999; von der Schulenburg et al., 1999; von der Schulenburg et al., 2001).

Вдоль участка ITS1 *C. sinensis* выявлено 17 повторов разного размера. Внутренние повторы характерны для эволюции ITS1 в разных группах организмов и являются результатом «проскальзывания» при репликации ДНК, неравном кроссинговере и неравновесной геномной конверсии. Кроссинговер и геномная конверсия могут приводить к изменчивости или, напротив, гомогенизации последовательностей, то есть привести к согласованной эволюции (Dover, 1982). В целом ряде организмов, в том числе у трематод (van Herwerden et al., 1998, van

Herwerden et al., 1999, Warberg et al., 2005), нематод (Subbotin et al., 2011) и цестод (Bowles et al., 1995) были обнаружены как длинные, так и короткие повторы, приводящие к изменениям размера ITS1 отдельных особей.

Хорошо известно, что определенные мотивы в последовательностях рДНК необходимы для инициирования и регулирования экспрессии рибосомных генов. У эукариот существует три известных регуляторных мотива: ТАТААТ, ССААТ и GC-боксы. Последние содержат последовательности GGCGG, CCCGCC и CCGCCC, которые могут выступать в качестве энхансеров (усилителей). В нашем исследовании мы обнаружили два варианта вышеперечисленных GC-боксов для ITS1 *C. sinensis*. Регуляторные мотивы чаще встречаются в тандемно повторяющихся последовательностях внешних транскрибируемых спейсеров. Однако они также могут располагаться и в других регионах, таких как ITS1, для усиления их эффективности через частоту копирования. Такие множественные регуляторные повторы ранее были обнаружены в ITS1 для ряда видов, принадлежащих к трематодам из трех родов: *Paragonimus* Braun, 1899, *Schistosoma* и *Dolichosaccus* Johnston, 1912 (van Herwerden et al., 2003).

Изменчивость, как в размере, так и в количестве нуклеотидных замен для ITS1 *C. sinensis* была достаточно низкой, что является доказательством эффективного действия механизмов согласованной эволюции рДНК в геноме, то есть создания копий генов и спейсерных участков рРНК, максимально идентичных друг другу (Dover, 1982). Однако даже небольшая вариация в длине участка ITS1 оказывает существенное влияние на вторичную структуру рРНК-транскрипта и, вероятно, на инфицирующую способность вида. Так моделирование вторичной структуры показывает, что дополнительные повторы (5 пн) уменьшают энергию фолдинга и стабилизируют вторичную структуру. Такие риботипы могут быть более успешным для эволюционной адаптации печеночной трематоды. Интересно, что эндемичные районы с тяжелой эпидемиологической ситуацией широко распространены в северном Китае (провинция Хэйлуцзянь) и в Корее (Lun et al., 2005; Hong, Fang, 2012), и в настоящем исследовании большое количество образцов с этих территорий характеризуется наличием вставки в

последовательностях ITS1. Для образцов *C. sinensis* из России, где эпидемиологическая ситуация не так усугублена, паттерн изменчивости ITS1, связанный со вставкой, отличается от данных для китайской печеночной двуустки из Китая и Кореи, несмотря на близкое расположение ареалов паразита в этих странах. Однако во Вьетнаме, где клонорхоз распространен достаточно широко (Hung et al., 2013a), выборка также характеризуется небольшим количеством образцов со вставкой. Тем не менее, не исключено, что при расширении выборки из Вьетнама возможно обнаружение большего количества образцов со вставкой. Также вышеуказанное несоответствие можно объяснить наличием для вьетнамских популяций других вариантов адаптивной изменчивости.

При изучении образцов трематод из географически изолированных популяций России и Вьетнама получена новая информация о внутривидовой изменчивости нуклеотидных последовательностей ITS1 *C. sinensis*. Впервые обнаружены различные варианты внутригеномного полиморфизма ITS1 для китайской печеночной двуустки. Наличие фиксированной изменчивости в различных клонах было подтверждено проведением независимых ПЦР, что исключает возможность того, что они являются результатом артефактов реакции.

Гетерогенность в участке ITS1 могла возникнуть на партеногенетической стадии жизненного цикла *C. sinensis* в результате высокой репликативной активности спороцист и редий. Наличие клональной генетической изменчивости зарегистрировано для различных видов трематод (van Herwerden et al., 2000; Králová-Hromadová et al., 2010). Для выборок из Вьетнама обнаружено большее количество нуклеотидных последовательностей с внутригеномным полиморфизмом. Существует вероятность, что наличие нескольких вариантов нуклеотидных последовательностей ITS1 в одном организме увеличивает устойчивость паразита к внешним воздействиям, в том числе и к лекарственным средствам, поскольку ранее была обнаружена низкая чувствительность к празиквантелу для пациентов с клонорхозом из Вьетнама (Tinga et al., 1999).

Выраженный внутригеномный полиморфизм ранее выявлен для участка ITS1 различных организмов, в том числе гельминтов, например, *Paragonimus*

westermani Kerbert, 1878 (van Herwerden et al., 1999), *Schistosoma japonicum* (van Herwerden et al., 1998) и *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Králová-Hromadová et al., 2010). Внутригеномный полиморфизм рДНК, как правило, связан с такими генетическими явлениями, как полиплоидия, интрогрессивная гибридизация, партеногенез, а также с множественностью вариантов последовательностей рДНК (van Herwerden et al., 1998; Rosselló et al., 2007; Králová-Hromadová et al., 2010).

На основе анализа изменчивости последовательностей ITS1 с учетом данного типа полиморфизма построена сложная внутривидовая филогенетическая сеть. Также нами введено понятие «нулевого» риботипа, поскольку реальные дистанции (количество замен) между риботипами с данным типом полиморфизма < 1 .

Использование в анализе короткого фрагмента ITS1 позволило получить дополнительные данные о генетической изменчивости *S. sinensis*. Одним из интересных наблюдений является разделение всех нуклеотидных последовательностей на 2 группы: с нуклеотидными заменами до 5 пн вставки и с заменами после нее. При этом в анализируемой выборке отсутствовали образцы с нуклеотидными заменами в обоих участках одновременно. Совокупность последовательностей с изменчивостью, локализующейся до вставки, включает в себя образцы из всех стран (России, Вьетнама, Китая и Кореи), тогда как последовательности с заменами после вставки принадлежат только различным регионам Китая. Данный факт говорит в пользу того, что адаптивная способность китайских образцов *S. sinensis* из южных регионов, вероятно, выше, что может негативно влиять на эпидемиологическую ситуацию в стране.

Подобные различия в уровне полиморфизма ранее были обнаружены для *S. sinensis* из разных регионов Китая. Ранее в Китае были выделены две зоны эндемизма для *S. sinensis*: северная и южная (Qian et al., 2012). На основе анализа произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) и ПЦР мобильных генетических элементов (MGE) экземпляры из провинции Хэйлуцзян (северный Китай) оказались генетически ближе и с меньшим уровнем полиморфизма, чем

собранные в провинции Гуандун (южный Китай) (Lai et al., 2008). Авторы предположили, что генетическая изменчивость в китайской печеночной двуустке из субтропических регионов накапливается гораздо быстрее, чем в более холодных районах в связи с большим количеством поколений в жизненных циклах. Наши данные противоречат данному предположению, поскольку Вьетнам входит в субтропический регион, то есть смена поколений паразита должна быть достаточно быстрой. Однако значения генетической изменчивости во вьетнамских популяциях сходны со значениями для выборки из России. Поэтому можно сделать заключение, что высокий уровень полиморфизма для выборки из южного Китая, скорее всего, связан не с теплым климатом, а с тем, что данный регион является центром происхождения многих видов, в том числе *C. sinensis* (Lei et al., 2003). От южного Китая северную границу Вьетнама отделяет горный хребет Хоанг Лиен Шон, протянувшийся в юго-восточном направлении и, вероятно, частично ограничивающий распространение видов из Китая, что оказывает влияние на генетическую изменчивость *C. sinensis* во Вьетнаме.

Имеющиеся данные позволяют предположить, что различные типы полиморфизма ITS1 могут иметь эволюционное и адаптивное значение, в том числе влиять на инфицирующую способность *C. sinensis*. Хотя роль повторяющихся элементов в последовательностях рРНК пока неизвестна, их вклад в адаптивную эволюцию паразитов многократно обсуждался (Biemont, Vieira, 2006; Subbotin et al., 2011). Данные о том, что ITS1 включает в себя информацию о вирулентности, были получены для представителей рода *Leishmania* Ross, 1903 (Schönian et al., 2001). На основе анализа регуляторного мотива была предложена возможная функциональная роль для ITS1 – регулирование специфичности рибосомной транскрипции генов гельминтов на уровне ткани, а также на разных жизненных стадиях (van Herwerden et al., 2003). В роде *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931 изменчивость последовательности ITS1 коррелирует с типами последовательностей гена 18S рДНК (Köhler et al., 2006). Для возбудителя малярии, паразита насекомых и позвоночных, два различных гена малой субъединицы рРНК используются на различных этапах жизненного

цикла. Это сообщение было первым и до сих пор единственным примером геномной эволюции путем, так называемого, «рождения и смерти» для семейства генов рДНК (Rooney, 2004).

Таким образом, несмотря на эволюционную консервативность, выбранный маркер предоставляет новые данные для понимания генетического разнообразия и молекулярной организации последовательностей в кластере рДНК *C. sinensis* и дает основу для поиска отношений между инфекционной способностью паразита и структурной организацией некодирующих последовательностей рДНК.

4.2. Генетическая изменчивость последовательностей гена *cox1* мтДНК

ДНК митохондрий преимущественно состоит из кодирующих последовательностей и передается по материнской линии. Циклы деления митохондрий независимы от делений клетки, поэтому мутации в мтДНК накапливаются гораздо быстрее, чем в ядерной ДНК. В связи с этим, митохондриальные маркеры являются более чувствительными для внутривидового анализа (Vawter, Brown, 1986).

Настоящее исследование является первым анализом генетической изменчивости популяций *C. sinensis* на основе полноразмерных последовательностей гена *cox1* и предоставляет новые данные о генетическом разнообразии китайской печеночной двуустки. Кроме того, впервые проведено сравнение самые северные (Россия) и наиболее южные (Вьетнам) популяции *C. sinensis*. Данный маркер оказался эффективным для изучения филогеографии, популяционной структуры и динамики генетических процессов в популяциях различных организмов (Avice, 2000).

В целом, распределение нуклеотидных замен, GC-состав и использование кодонов для гена *cox1* *C. sinensis* аналогичны значениям для других видов трематод, таких как *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, *Schistosoma mansoni* и *Opisthorchis felinus* (Le et al., 2002a; Le et al., 2004; Shekhovtsov et al., 2010). На исследуемой территории не обнаружено статистически подтвержденного подразделения популяции при использовании ряда подходов, основанных на

анализе нуклеотидного разнообразия: F_s -статистики, точного теста популяционной дифференциации и теста Мантеля. Кроме того, полученные данные не выявили существенной генетической дифференциации между региональными популяциями *C. sinensis*, несмотря на значительные географические расстояния между Россией и Вьетнамом (более 4000 км). Отсутствие генетической дифференциации может возникнуть вследствие высоких генных потоков между популяциями паразита, которые нейтрализуют локальные адаптации (Slatkin, 1987; Lively, 1999).

Тем не менее, при сравнении российских и вьетнамских образцов *C. sinensis* выявлены значительные различия между гаплотипами гена *cox1*. Скорее всего, эти данные частично являются следствием ограниченной выборки для каждого локалитета, что привело к обнаружению только часто встречающихся гаплотипов. Однако это не может объяснить большие отличия между гаплотипами, которые выявлены в данном исследовании. Возможно, в решении этого вопроса будет более эффективным использование других молекулярных маркеров, например, RAPD (Семенова и др., 2007; Корсуненко и др., 2009; Sire et al., 2001; Semyenova et al., 2003, Theron et al., 2004) или микросателлитных маркеров (Blair et al., 2001; Curtis et al., 2002; Agola et al., 2006; Rudge et al., 2008; Agola et al., 2009; Gower et al., 2013). Оба метода весьма успешно использовались для оценки генетического разнообразия разных видов трематод.

Особенности генетического разнообразия и популяционной структуры паразитов зависят от сочетания многих факторов, в частности, наличия сложного жизненного цикла. В отличие от свободно живущих организмов, паразиты связаны с двумя средами обитания: внешней средой, окружающей хозяина паразита, и внутренней средой самого хозяина. Абиотические факторы оказывают непосредственное влияние на свободноживущую стадию паразита, а также косвенное – через хозяев (Harvell et al., 2002; van Dijk et al., 2010; Sherrard-Smith et al., 2013). Известно, что трематоды заражают до четырех хозяев в процессе их жизненного цикла. Последовательная смена хозяев связана с чередованием бесполого (клонального) и полового размножения, которое включает

самооплодотворение, инбридинг или скрещивание (Criscione et al., 2005; Prugnolle et al., 2005a; Sherrard-Smith et al., 2013).

Согласно одной из гипотез, самыми древними хозяевами трематод являются моллюски (Гинецинская, 1968). Поэтому считается, что паразиты позаимствовали эквивалентные молекулы этих хозяев и успешно их используют, что в значительной степени способствует высокой специфичности паразито-хозяинных отношений (Wide et al., 2006; Shalaby et al., 2010). По литературным данным около 10 видов пресноводных моллюсков, принадлежащих к разным семействам, являются первыми промежуточными хозяевами *C. sinensis* (Hung et al., 2013a; Petney et al., 2013). Однако в южной части Дальнего Востока России первыми промежуточными хозяевами *C. sinensis* являются *Parafossarulus manchouricus* и *P. spiridonovi* (Bithyniidae), в то время как во Вьетнаме первые промежуточные хозяева – более южные виды моллюсков: *Parafossarulus striatulus* (Bithyniidae) и *Melanoides tuberculata* (Thiaridae) и, возможно, *Bithynia fuchsianus* (Bithyniidae) и *Alocinma longicornis* (Hydrobiidae) (Посохов, 2004; Нго, Ермоленко, 2011; Беспрозванных и др., 2012; De, 2004; Yoshida, 2012; Hung et al., 2013a).

Вторыми промежуточными хозяевами китайской печеночной двуустки являются в основном рыбы из семейства Cyprinidae. Более чем 100 видов пресноводных рыб инфицируются *C. sinensis* и, как правило, интенсивность инфекции в их тканях существенно выше, чем в первом промежуточном хозяине (Hung et al., 2013a; Hung et al., 2013b). Во Вьетнаме вторые промежуточные хозяева – это рыба-ползун *Anabas testudineus*, золотой карась *Carassius auratus* Linnaeus, 1758, ильный карп *Cirrhina molitorella*, пятнистый змееголов *Channa maculata* Lacepede, 1802 и белый толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix* (Ле и др., 2013; De, 2004). На юге Дальнего Востока России вторыми промежуточными хозяевами *C. sinensis* являются амурский чебачок *Pseudorasbora parva*, озерный маньчжурский голянь *Phoxinus perenurus mantschuricus*, амурский сазан *Cyprinus carpio haematopterus* (в р. Амур), серебряный карась *Carassius gibelio* и обыкновенный верхогляд *Chanodichthys erythropterus* (Посохов, 2004; Беспрозванных и др., 2012; Yoshida, 2012).

Как известно, *C. sinensis* заражает людей, а также различных диких и домашних млекопитающих, питающихся рыбой, например, собак, кошек, свиней, крыс и т. д. (Посохов, 2004; Lun et al., 2005). Подвижность хозяина – основной фактор, определяющий поток генов паразита, а для видов со сложным жизненным циклом поток генов контролируется наиболее мобильным хозяином (Jarne, Theron, 2001; Criscione et al., 2005; Prugnolle et al., 2005a; Prugnolle et al., 2005b). Зачастую мобильность окончательного хозяина является самой высокой. Данный хозяин может повлиять на генетическую структуру паразита, поскольку обеспечивает высокий поток генов между популяциями, что приводит к снижению генетической дифференциации (Criscione, Blouin, 2004; Louhi et al., 2010).

Следует отметить, что трематоды имеют менее структурированные популяции и большее генетическое разнообразие по сравнению с пресноводными моллюсками, их первыми промежуточными хозяевами (Dybdahl, Lively, 1996; Criscione, Blouin, 2004; Keeney et al., 2007). Показано, что распространение пресноводных моллюсков и их способ размножения оказывают влияние на генетическую дифференциацию их паразитов-шистосом (Mavárez et al., 2002). Ранее считалось, что партеногенетическое потомство трематод (церкарии) в моллюсках является множеством генетически однородных особей (клонов). В настоящее время для многочисленных видов трематод известны случаи высокой генетической неоднородности церкарий из одной и той же спороцисты, а также между дочерними спороцистами (Семенова и др., 2005; Семенова и др., 2007; Корсуненко и др., 2009; Wayne, Grevelding, 2003). Тем не менее, генетическое разнообразие личиночных стадий трематод внутри хозяина-моллюска гораздо выше, чем для взрослых сосальщиков в окончательном хозяине: в одном окончательном хозяине может сохраниться приблизительно половина от общего генетического разнообразия, обнаруженного для всей популяции паразита (Theron et al., 2004).

Исходя из ранее полученных данных (Liu et al., 2012; Sun et al., 2013) и результатов нашего исследования, у *C. sinensis* отсутствует видоспецифичность к

окончательным хозяевам. Такая ситуация, по-видимому, возникла вследствие существенно менее длительного эволюционного взаимодействия по сравнению с первым промежуточным хозяином. Так, например, согласно литературным данным, низкий уровень генетической дифференциации был обнаружен между образцами *C. sinensis*, выделенными из рыб, кошек и собак. В то же время каждая выборка характеризовалась высоким и практически идентичным уровнем нуклеотидного разнообразия (Sun et al., 2013). Между тем, были обнаружены специфичные к хозяину гаплотипы среди образцов *C. sinensis*, выделенных из кошки. Хотя достоверно неизвестно, является ли это адаптацией к хозяину или географическим условиям его обитания (Sun et al., 2013). Существуют и другие примеры генетической подразделенности популяций паразита между видами хозяев или между расами вида, хотя различия, чаще всего, связаны с географическими особенностями обитания (McCoy et al., 2001; Johnson et al., 2002; Le et al., 2002b; Wang et al., 2006; Rudge et al., 2009).

В нашем исследовании среди изученных популяций был выявлен четкий географический вектор распределения генетического разнообразия. Эти результаты подтверждают ранее опубликованные данные, основанные на анализе маркеров яДНК (Lai et al., 2008). По-видимому, географическое расположение локальных популяций *C. sinensis* может привести к увеличению (при наличии больших географических расстояний) или уменьшению (когда есть близко расположенные локалитеты) генетической дифференциации. Примечательно, что вьетнамские популяции, для которых отсутствуют общие гаплотипы, принадлежат к двум разным зоогеографическим субрегионам: северная популяция принадлежит к Китайскому субрегиону, а южная – к Индо-Малайской подобласти (Старобогатов, 1970). В отличие от Вьетнама, все российские популяции имеют общие гаплотипы и принадлежат к одному и тому же Амурско-Японскому субрегиону (Старобогатов, 1970). Тем не менее, все локальные популяции из обеих стран при сравнении друг с другом отличались по частоте гаплотипов, что может быть следствием глубокой адаптации паразита к местным условиям, в частности, к окружающей среде, в том числе водному и

температурному режимам, солености воды, условиям освещенности и промежуточным хозяевам. Этот вывод согласуется с гипотезой «Черной Королевы», согласно которой взаимодействие между хозяином и паразитом приводит к постоянному естественному отбору посредством адаптации и контрадаптации, а также способствует возникновению пространственной мозаики (van Valen, 1973; Ebert, 1994; Gandon et al., 1996; Lively, 1999; Peters, Lively, 1999; Gandon, Michalakis, 2002). Антагонистическая коэволюция предполагает сложные эволюционные последствия, зачастую даже через небольшой промежуток времени. Это приводит, в частности, к большей генетической дивергенции между «вторичными» популяциями (Lively, Dybdahl, 2000; Paterson et al., 2010). Локальная адаптация паразитов к своим хозяевам способствует более широкому распространению паразита (Davies et al., 1999).

В этом исследовании впервые проанализирована изменчивость как нуклеотидной (ген *cox1*), так и аминокислотной (белок COX1) последовательностей *C. sinensis*. В сайтах с различной функциональной значимостью обнаружена только одна информативная замена (Val → Met) в белке COX1 для вьетнамской популяции. Данная замена не только меняет первичную структуру белка, но также может влиять на функцию белка, благодаря своему расположению в функционально важной области. К тому же изменяется функциональная группа в аминокислоте, что может в целом повлиять на конфигурацию и функцию белка. Замена Val → Met должна иметь большое значение, поскольку у млекопитающих даже замена одного серосодержащего метионина в белках приводит к необратимым последствиям, таким как наследственные заболевания (Murray et al., 1992; Rodriguez-Martinez et al., 2010). Кроме того, существует гипотеза, согласно которой нуклеотидные замены в третьем положении кодона, обычно не влияющие на первичную последовательность белка, могут изменить угол, под которым следующая аминокислота включается в растущую полипептидную цепь в процессе синтеза белка (Кушелев, Соколик, 2012). Таким образом, для *C. sinensis* нуклеотидные замены в третьей позиции кодона гена *cox1* также могут повлиять на

пространственную структуру белка и, следовательно, его функции. Например, они могут изменить операционную эффективность функциональных сайтов в первой субъединице цитохром *c*-оксидазы.

Гипотетически, особенности молекулярной организации, обнаруженные для гена *cox1* вьетнамских популяций и предсказанные для белка COX1, могут быть связаны с высокой резистентностью паразита в этой стране к празиквантелу (Tinga et al., 1999), который в других регионах показал высокую эффективность (Choi et al., 2006). Такое предположение основывается на данных о том, что белок COX1 может принимать участие в иммунном ответе на бактериальную инфекцию (Abumourad, 2011). Существует несколько примеров, когда определенные молекулярные характеристики паразитов тесно связаны с их адаптивными способностями и инфекционной способностью (Schönian et al., 2001; Rooney, 2004; Subbotin et al., 2011). Ранее мы пришли к тому же выводу при анализе данных по ядерным последовательностям рДНК *C. sinensis*. Кроме того, есть свидетельства, что гены, связанные с устойчивостью к инфекции, имеют особенно высокие темпы молекулярной эволюции (Blanc et al., 2005; Obbard et al., 2006; Barrett et al., 2009). По крайней мере, это может быть важным для популяций *C. sinensis*, чья способность развивать лекарственную резистентность будет зависеть как от потока генов между популяциями, так и генетического дрейфа в них (Criscione et al., 2005).

В данном исследовании было показано, что использование полной последовательности гена *cox1* является более эффективным для реконструкции внутривидовой филогении *C. sinensis* по сравнению с фрагментами этого гена, в том числе наиболее изменчивого и обычно используемого 3'-конца. В частности, из-за ограниченного набора информативных сайтов короткие фрагменты генов генерируют простую, звездообразную структуру, подразумевая ложное прохождение вида через генетическое бутылочное горлышко в его недавнем прошлом. Звездообразная филогения связана с быстрым распространением вида из рефугиума, что приводит к небольшой генетической дифференциации в колонизированной области (Hewitt, 1996). Данная гипотеза не находится в

строгом соответствии с нашими результатами по полной последовательности гена *cox1*. Помимо этого, L-образная кривая графиков распределения попарных генетических дистанций для частичной последовательности гена *cox1* говорит о вероятности прохождения популяций через генетическое бутылочное горлышко в недавнем прошлом (Excoffier, Schneider, 1999). Эти данные также противоречат результатам, полученным для полной последовательности гена *cox1*. Таким образом, для получения более точной характеристики генетического разнообразия *C. sinensis* необходимо использовать полноразмерную последовательность гена *cox1*.

Однако анализ частичной последовательности позволяет использовать данные из других стран, а также дополнительные последовательности из России и Вьетнама. Ранее для выборки *C. sinensis* из Китая была дана оценка значения внутривидовой изменчивости частичных последовательностей гена *cox1* – 0-1.6% (Li et al., 2011), что соответствует среднему значению внутривидовой дивергенции мтДНК для семи видов трематод из различных семейств, которое варьирует от 0.03 до 1.3% (Vilas et al., 2005). Уровень генетической дифференциации, наблюдаемый в данном исследовании, равен 0-1.88%, что также соответствует значению внутривидовой изменчивости для видов трематод. Как и в случае анализа ITS1-участка, генетическая изменчивость выборки из Китая гораздо выше, чем для последовательностей из России и Вьетнама. Ранее мы отмечали, что это, скорее всего, связано с достаточно высоким уровнем инфицирования населения Китая *C. sinensis*.

Для демографического анализа и оценки времени расхождения популяций исследуемого вида необходимо использовать молекулярные часы. Обычно молекулярные часы калибруют при сравнении скорости изменения ДНК тех видов, время расхождения которых было надежно установлено по ископаемым останкам. Однако для трематод нет палеонтологических данных. Гинецинская (1968) в своей работе указывает, что филогенетически самыми древними хозяевами трематод, скорее всего, являются моллюски. Если исходить из правила Фаренгольца, которое говорит, что степень родства между паразитами отражает

филетическую близость их хозяев, то обратное утверждение также является правомерным (Лебедев, 1995). То есть возможно использование палеонтологических данных по первым промежуточным хозяевам трематод. Аттвуд с соавторами (Attwood et al., 2008) в своей работе определяют молекулярные часы *Schistosoma mansoni* по первому промежуточному хозяину. К сожалению, это единственный вид трематоды, для которого определено значение скорости молекулярных часов. Так как палеонтологические данные по первому промежуточному хозяину исследуемого нами вида отсутствуют, мы вынуждены оперировать значением скорости накопления нуклеотидных замен 2.5% на один миллион лет, определенным для шистосом.

Глобальные климатические колебания в плейстоцене, как известно, имели глубокое влияние на распределение видов и генетическую структуру видов во всем мире (Avice, 2000; Hewitt, 2000). Китайская печеночная двуустка – это азиатский вид. Исторические записи и археологические свидетельства об инфицировании человека *S. sinensis* указывают на древнее происхождение этого вида в Китае (Sun et al., 2013). Из-за муссонов климатические колебания в Азии в плейстоцене не были столь же существенными, как в Европе или Америке, хотя холодный и засушливый климат привел к исчезновению многих видов и сильно повлиял на эволюционные процессы и распределение растений и животных (Li et al., 1979; Qiu et al., 2011; Wang et al., 2013). История популяций *S. sinensis* на основе данных полной последовательности гена *cox1* и времени расхождения линий мтДНК может быть прослежена до обширного Заальского оледенения (230-100 тысяч лет назад) в Европе, которое соответствует предпоследнему плейстоценовому оледенению в Китае (Liu et al., 2000; Zheng et al., 2002; You et al., 2010). Приблизительное время расхождения филогенетических линий от их предполагаемого предка может быть индикатором пространственного распределения китайской печеночной двуустки во время последнего и одного из самых теплых межледниковых периодов (130-75 тысяч лет назад) с последующим уменьшением численности популяции в течение последнего оледенения в Китае (74-11.5 тысяч лет назад) (Liu et al., 2001; You et al., 2010). Вероятную

популяционную экспансию во время последнего межледникового периода также можно предположить на основе данных частичной последовательности гена *cox1* с привлечением дополнительных образцов из России, Китая и других стран Юго-Восточной Азии.

Наличие разных филогенетических линий внутри исследованного вида предполагает изоляцию и дифференциацию популяций из нескольких рефугиумов, что может быть связано с наличием биогеографических барьеров, таких как горы, реки и пустыни (Avice, 2000). Как известно, в Восточной Азии, горный хребет Малый Хинган и Маньчжуро-Корейские горы являются эффективными естественными барьерами при миграции животных (Driscoll et al., 2009). Помимо этого, к изменениям в распределении многих популяций животных и растений приводит наличие Цинхай-Тибетского плато в Китае (You et al., 2010). На юге Дальнего Востока России также произошли значительные изменения в речных системах, отчасти вследствие вулканической активности во время среднего плейстоцена (Короткий и др., 2011).

Согласно теории (Excoffier, Schneider, 1999), график распределения попарных генетических различий с пиками в диапазоне от одного или более предполагает общий популяционный рост и отсутствие влияния эффекта генетического бутылочного горлышка в недавней эволюционной истории *S. sinensis*. Значительные отрицательные значения в тестах на нейтральность, полученные в данном исследовании, характерны для популяций, которые недавно прошли демографическую экспансию (Tajima, 1989; Fu, 1997). Обширная пространственная экспансия часто дает сигнал, подобный панмиктической популяции, но только в том случае, когда соседние популяции имеют большое количество мигрантов (Calvo et al., 2009). Учитывая, что ошибка, связанная с частотой мутаций, достаточно велика, и полученная оценка времени, основанная на молекулярных данных, является приблизительной (Arbogast et al., 2002), популяционная экспансия *S. sinensis*, скорее всего, произошла в позднем плейстоцене после последнего ледникового максимума (23-15 тысяч лет назад). Данное значение гораздо ниже, чем для набора данных по частичной

последовательности гена *cox1* с привлечением образцов из Китая. Очевидно, что история экспансии вида тесно связана с миграцией древних человеческих племен, высокой активностью и национальными традициями современного населения.

Сравнение нуклеотидного и гаплотипического разнообразия также может дать представление о демографической истории популяции и позволяет сделать предположение о прошлых демографических событиях (Avisе, 2000; Painter et al., 2007). Так высокие гаплотипические и относительно низкие нуклеотидные отличия, которые наблюдались в нашем исследовании для российских и вьетнамских популяций, могут быть результатом происхождения от небольшой предковой популяции с последующей длительной изоляцией. Южный Китай является одним из наиболее богатых по видовому разнообразию и, возможно, служил рефугиумом во время плейстоценового оледенения или был центром видообразования (Wang, 1992; Lei et al., 2003; Dai et al., 2011). Один из недавних филогеографических сценариев предполагает длительную изоляцию и выживание группы видов в нескольких рефугиумах Китая в период четвертичного изменения климата (Qiu et al., 2011). Рефугиумы плейстоцена были зарегистрированы в восточной части Китая и в Юго-Восточном плато, а такие районы, как бассейны Юньнань и Сычуань известны, как крупные реликтовые рефугиумы для многих видов (You et al., 2010). Корейский полуостров представляет большой интерес, как потенциальный рефугиум для *C. sinensis* в плейстоцене. Этот регион с южным умеренным горным климатом, вероятно, позволил ряду видов выжить в самые холодные периоды плейстоцена (Sakka et al., 2010).

Убежище для видов должно характеризоваться не только сравнительно стабильной обстановкой во время колебаний климата, но также способностью поддерживать высокий уровень генетического разнообразия (Hewitt, 1996; Avisе, 2000). В отличие от России, Вьетнам не так сильно зависел от климатических изменений, и окружающая среда в данной стране была относительно стабильной в течение глобальных изменений климата в плейстоцене. Тем не менее, генетическое разнообразие вьетнамских и российских популяций, по нашим оценкам, почти идентично. В то же самое время популяции, населяющие

центральный Китай, демонстрируют увеличение генетического разнообразия и наличие прямых связей с древними образцами (Sun et al., 2013).

Таким образом, в настоящей работе предоставлены новые данные о генетическом разнообразии популяций *C. sinensis* внутри и между двумя географическими регионами (Россия и Вьетнам). Мы считаем, что эти данные могут иметь важное значение для решения эпидемиологических, эволюционных и медицинских задач. Анализ участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК выявил новый вид изменчивости для *C. sinensis*, а также особенности распределения изменчивости вдоль участка ITS1. Полноразмерный ген *cox1* и предполагаемая структура белка COX1 оказались перспективными молекулярными маркерами для генетических исследований трематод. Результаты указывают на глубокую локальную адаптацию паразита к окружающей среде, включая промежуточных хозяев, и наличие высокого потока генов по всему видовому ареалу. Эти данные важны для понимания филогеографии *C. sinensis*, его паразито-хозяйинных отношений и способности развивать лекарственную устойчивость, а также для эпидемиологии клонорхоза в условиях глобального потепления климата.

В следующих исследованиях необходимо увеличение количества выборок и расширение круга молекулярных маркеров для получения дополнительной информации о генетической структуре популяций китайской печеночной двуустки. Это позволит лучше понять историю китайской печеночной двуустки в плейстоцене и прольет свет на ее миграционные маршруты в период постледниковой эпохи. При этом важно учитывать биологические особенности этого паразитического вида, которые могут повлиять на микроэволюционные процессы, происходящие в популяциях.

ВЫВОДЫ

1. По данным анализа нуклеотидного полиморфизма полноразмерных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК между локальными и региональными выборками *C. sinensis* существуют высокие генные потоки, предполагающие панмиксию видовой популяции.
2. Распределение гаплотипических частот и нуклеотидного разнообразия вдоль гена *cox1* и спейсерного участка ITS1 имеет выраженный географический вектор, что указывает на глубокую адаптацию паразита к локальным условиям окружающей среды.
3. Уровни генетического разнообразия популяций из России и Вьетнама сопоставимы между собой, но существенно ниже, чем в популяциях Китая.
4. Участки 5.8S-ITS2 рДНК инвариантны; вторичная структура транскриптов ITS2 эволюционно консервативна и состоит из открытой петли с четырьмя спиралями; межвидовые отличия локализованы в верхней части спиралей H2, H3 и H4.
5. Участки ITS1 рДНК изменчивы на меж- и внутригеномном уровнях, содержат мотивы, гомологичные энхансерным последовательностям эукариот. Вторичная структура транскриптов ITS1 состоит из двух ветвей, разделенных длинным двуспиральным участком. Одна из ветвей консервативна, а другая зависит от наличия пентануклеотидной вставки, которая уменьшает энергию фолдинга и стабилизирует молекулу рРНК.
6. Аминокислотная последовательность белка COX1, прогнозированная по данным нуклеотидной последовательности гена *cox1*, в популяциях Вьетнама имеет несинонимичную замену Val→Met в функционально важной области.
7. Высокая частота последовательностей ITS1 с пентануклеотидной вставкой, обнаруженная в Корее и северном Китае, коррелирует с тяжелой эпидемиологической ситуацией на этих территориях, а замена Val→Met в белке COX1 – с резистентностью *C. sinensis* к празиквантелу во Вьетнаме.

8. Филогенетический и историко-демографический анализы предполагают формирование региональных филогенетических линий *C. sinensis* на территории центрального Китая в среднем плейстоцене, популяционную экспансию в позднем плейстоцене и отсутствие событий генетического бутылочного горлышка в недавней истории вида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях (3-е перераб. и дополн. изд.). – М.: ИКЦ Академкнига, 2003. – 431 с.
2. Атопкин Д.М., Богданов А.С., Челомина Г.Н. Генетическая изменчивость и дифференциация полевой мыши *Apodemus agrarius*: результаты RAPD-PCR анализа // Генетика. 2007. Т. 43. № 6. С. 804-817.
3. Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В. Природноочаговые гельминтозы человека в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 2005. – 120 с.
4. Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В., Румянцева Е.Е., Воронок В.М., Барткова А.Д. Клонорхис (*Clonorchis sinensis*) и клонорхоз в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 2013. – 82 с.
5. Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В., Румянцева Е.Е., Маслов Д.В., Воронок В.М., Татанова Ю.В. Нозоареалы клонорхоза в Приморском крае // Мед. паразитол. 2012. № 2. С. 7-14.
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. Гинецинская Т.А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. – Л.: Наука, 1968. – 410 с.
8. Катохин А.В., Шеховцов С.В., Konkow S., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Федоров К.П., Локтев В.Б., Муратов И.В., Ohyama F., Махнева Т.В., Пельтек С.Е., Мордвинов В.А. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям // ДАН. 2008. № 421. С. 214-217.
9. Короткий А.М., Коробов В.В., Скрыльник Г.П. Аномальные природные процессы и их влияние на состояние геосистем юга российского Дальнего Востока. – Владивосток: Дальнаука, 2011. – 263 с.

10. Корсуненко А.В., Тютин А.В., Семенова С.К. Клональная и популяционная RAPD-изменчивость церкарий из спороцист *Vucephalus polymorphus* (Trematoda: Vucephalidae) // Генетика. 2009. № 45. С. 73-80.
11. Круглякова Л.В. Григоренко А.А., Чертов А.Д. Случай клонорхоза человека высокой интенсивности с летальным исходом // Гельминтозы Дальнего Востока. 1987. С. 55-59.
12. Кушелев А.Ю., Соколик В.В. Пикотехнология – новый подход в моделировании пространственной структуры белка // Материалы заочной Международной научно-практической конференции «Современная наука: тенденции развития» (Краснодар, 24.01.2012). – Краснодар: НИЦ Априори, 2012. – С. 203-207.
13. Ле Н.Т., Нго Х.З., Ермоленко А.В. Трематоды наземных позвоночных Вьетнама. – Владивосток: Дальнаука, 2013. – 165 с.
14. Лебедев Б.И. Очерки по биоразнообразию и эволюционной паразитологии. – Владивосток: Дальнаука, 1995. – 208 с.
15. Нго Х.З., Ермоленко А.В. Распространение возбудителя клонорхоза человека и животных в Северном Вьетнаме // Мед. паразитол. 2011. № 4. С. 39-41.
16. Посохов П.С. Клонорхоз в Приамурье. – Хабаровск, 2004. – 187 с.
17. Посохов П.С., Довгалева А.С., Брюнеткина Н.М. Нераспознанный при жизни случай клонорхоза // Мед. паразитол. 1987. № 5. С. 45-46.
18. Семенова С.К., Хрисанфова Г.Г., Корсуненко А.В., Воронин М.В., Беэр С.В., Водяницкая С.В., Сербина Е.А., Юрлова Н.И., Рысков А.П. Мультилокусная изменчивость партеногенетического потомства – церкарий трематод разных видов (класс Trematoda) // ДАН. 2007. № 414. С. 570-573.
19. Семенова С.К., Хрисанфова Г.Г., Филиппова Е.К., Беэр С.А., Воронин М.В., Рысков А.П. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистосоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции // Генетика. 2005. № 41. С. 17-22.

20. Старобогатов Я.И. Фауна моллюсков и зоогеографическое районирование континентальных водоемов земного шара. – Л.: Наука, 1970. – 372 с.
21. Abumourad I.M.K. Cytochrome *c* oxidase subunit-1 (COX1) gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and characterization // Int. J. Gen. Eng. 2011. Vol. 1. N 1. P. 1-5.
22. Adams A.M., Murrell K.D., Cross J.H. Parasites of fish and risks to public health // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 1997. Vol. 16. N 2. P. 652-660.
23. Agola L.E., Mburu D.N., DeJong R.J., Mungai B.N., Muluvi G.M., Njagi E.N.M., Loker E.S., Mkoji G.M. Microsatellite typing reveals strong genetic structure of *Schistosoma mansoni* from localities in Kenya // Infect. Genet. Evol. 2006. Vol. 6. P. 484-490.
24. Agola L.E., Steinauer M.L., Mburu D.N., Mungai B.N., Mwangi I.N., Magoma G.N., Loker E.S., Mkoji G.M. Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers // Acta Trop. 2009. Vol. 111. P. 219-225.
25. Alasaad S., Soriguer R.C., Chelomina G., Sushitsky Y.P., Fickel J. Siberian tiger's recent population bottleneck in the Russian Far East revealed by microsatellite markers // Mammal. Biol. 2011. Vol. 76. P. 722-726.
26. Ando K., Sithithaworn P., Nuchjungreed C., Tesana S., Srisawangwong T., Limviroj W., Chinzei Y. Nucleotide sequence of mitochondrial COI and ribosomal ITSII of *Opisthorchis viverrini* in Northeast Thailand // Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 2001. Vol. 32. N 2. P. 17-22.
27. Anou N., Yanwen X., Youren F. *Schistosoma japonicum* strains: differentiation by RAPD and SSR-PCR // Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 2002. Vol. 33. N 4. P. 720-724.
28. Arbogast B.S., Edwards S.V., Wakeley J., Beerli P., Slowinski J.B. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2002. Vol. 33. P. 707-740.

29. 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 Negl. Trop. Dis. 2008. Vol. 2. N 3. e200.
30. Avise J.C. Molecular markers, natural history, and evolution (second edition). – Sunderland, MA: Sinauer, 2004. – 684 p.
31. Avise J.C. Phylogeography: The history and formation of species. – Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000. – 447 p.
32. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. Saunders N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1987. Vol. 18. P. 489-522.
33. Bae Y.A., Kong Y. Evolutionary course of *CsRn1* long-terminal-repeat retrotransposon and its heterogeneous integrations into the genome of the liver fluke, *Clonorchis sinensis* // Korean J. Parasitol. 2003. Vol. 41. P. 209-219.
34. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. N 1. P. 37-48.
35. Barrett L.G., Thrall P.H., Dodds P.N., van der Merwe M., Linde C.C., Lawrence G.J., Burdon J.J. Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini* // Mol. Biol. Evol. 2009. Vol. 26. P. 2499-2513.
36. Bayne C.J., Grevelding C.G. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones // J. Parasitol. 2003. Vol. 89. P. 1056-1060.
37. Biemont C., Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force // Nature. 2006. Vol. 443. P. 521-524.
38. Blair L., Webster J.P., Barker G.C. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa // Mol. Ecol. Notes. 2001. Vol. 1. P. 93-95.

39. Blanc G., Ngwamidiba M., Ogata H., Fournier P.-E., Claverie J.-M., Raoult D. Molecular evolution of *Rickettsia* surface antigens: evidence of positive selection // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22. P. 2073-2083.
40. Boore J.L. Animal mitochondrial genomes // Nucleic Acids Res. 1999. Vol. 27. P. 1767-1780.
41. Bounamous A., Lehrter V., Hadj-Henni L., Delecolle J.C., Depaquit J. Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2014. Vol. 109. N 4. P. 466-72.
42. Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., Ghissassi F.E.I., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichey L., Coglianò V. A review of human carcinogens – part B: biological agents // The Lancet Oncol. 2009. Vol. 10. P. 321-322.
43. Bowles J., Blair D., McManus D.P. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* // Parasitology. 1995. Vol. 110. P. 317-328.
44. Bray R.A., Gibson D.I., Jones A. Keys to the Trematoda. Vol.3. – Wallingford, Oxon: C.A.B. International, 2008. – 824 p.
45. Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V., Shekhovtsov S.V., Borovikov S.N., Goncharenko G.G., Lider L.A., Romashov B.V., Rusinek O.T., Shubitov S.K., Suleymanov M.M., Yevtushenko A.V., Mordvinov V.A. Low genetic diversity in wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felinus* suggests special demographic history of this trematode species // PLoS One. 2013. Vol. 8. N 4. e62453.
46. Cai X.Q., Liu G.H., Song H.Q., Wu C.Y., Zou F.C., Yan H.K., Yuan Z.G., Lin R.Q., Zhu X.Q. Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) // Parasitol. Res. 2012. Vol. 110. N 1. P. 235-243.
47. Calvo J.H., Calvete C., Martinez-Royo A., Estrada R., Miranda M.A., Borrás D., Monteys V., Sarto I., Pages N., Delago J.A., Collantes F., Lucientes J. Variation in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene indicate northward

expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain // Bull. Entomol. Res. 2009. Vol. 99. P. 583-591.

48. Campos Y.R., Carvalho O.S., Goveia C.O., Romanha A.J. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR // Acta Trop. 2002. Vol. 83. N 1. P. 19-27.

49. Chai J.Y., Murrell K.D., Lymbery A.J. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues // Int. J. Parasitol. 2005. Vol. 35. P. 1233-1254.

50. 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 // Int. J. Parasitol. 2014. Vol. 44. N 11. P. 795-810.

51. Cho P.Y., Lee M.J., Kim T.I., Kang S.Y., Hong S.J. Expressed sequence tag analysis of adult *Clonorchis sinensis*, the Chinese liver fluke // Parasitol. Res. 2006. Vol. 99. N 5. P. 602-608.

52. Choi B.I., Han J.K., Hong S.T., Lee K.H. Clonorchiasis and cholangiocarcinoma: etiologic relationship and imaging diagnosis // Clin. Microbiol. Rev. 2004. Vol. 17. P. 540-552.

53. Choi D., Lim J.H., Lee K.T., Lee J.K., Choi S.H., Heo J.S., Jang K.-T., Lee N.Y., Kim S., Hong S.-T. Cholangiocarcinoma and *Clonorchis sinensis* infection: a case-control study in Korea // J. Hepatol. 2006. Vol. 44. P. 1066-1073.

54. Clausen J.H., Madsen H., Murrell K.D., Van P.H., Thu H.N., Do D.T., Thi L.A.N., Mahn H.N., Dalsgaard A. Prevention and control of fish-borne zoonotic trematodes in fish nurseries, Vietnam // Emerg. Infect. Dis. 2012. Vol. 18. P. 1438-1444.

55. Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends Genet. 2003. Vol. 19. P. 370-375.

56. Coté C.A., Peculis B.A. Role of the ITS2-proximal stem and evidence for indirect recognition of processing sites in pre-rRNA processing in yeast // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29. P. 2106-2116.

57. Criscione C.D., Blouin M.S. Life cycle shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes // *Evolution*. 2004. Vol. 58. P. 198-202.
58. Criscione C.D., Poulin R., Blouin M.S. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes // *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14. P. 2247-2257.
59. Curtis J., Fraga L.A., de Souza C.P., Corrêa-Oliveira R., Minchella D.J. Widespread heteroplasmy in schistosomes makes an mtVNTR marker "nearsighted" // *J. Hered.* 2001. Vol. 92. N 3. P. 248-253.
60. Curtis J., Sorensen R.E., Minchella D.J. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers // *Parasitology*. 2002. Vol. 125. P. S51-S59.
61. Cutmore S.C., Miller T.L., Curran S.S., Bennett M.B., Cribb T.H. Phylogenetic relationships of the Gorgoderidae (Platyhelminthes: Trematoda), including the proposal of a new subfamily (Degeneriinae n. subfam.) // *Parasitol. Res.* 2013. Vol. 112. N 8. P. 3063-3074.
62. Dai C., Zhao N., Wang W., Lin C., Gao B., Yang X., Zhang Z., Lei F. Profound climatic effects on two East Asian black-throated tits (Ave: Aegithalidae), revealed by ecological niche models and phylogeographic analysis // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6. e29329.
63. Davies C.M., Webster J.P., Krüger O., Munatsi A., Ndamba J., Woolhous M.E.J. Host-parasite population genetics: a cross sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium* // *Parasitology*. 1999. Vol. 119. P. 295-302.
64. De N.V. Fish-borne trematodes in Vietnam // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2004. Vol. 35. P. 229-231.
65. Dover G.A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution // *Nature*. 1982. Vol. 299. P. 111-116.
66. Driscoll C.A., Yamaguchi N., Bar-Gal G.K., Roca A.L., Luo S., McDonald D.W., O'Brien S.J. Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct Caspian Tiger and its relationship to the Amur Tiger // *PLoS One*. 2009. Vol. 4. e4125.

67. Drosopoulou E., Tsiamis G., Mavropoulou M., Vittas S., Katselidis K.A., Schofield G., Palaiologou D., Sartsidis T., Bourtzis K., Pantis J., Scouras Z.G. The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): genome description and phylogenetic considerations // *Mitochondrial DNA*. 2012. Vol. 23. N. 1. P. 1-12.
68. Dung D.T., De N.V., Waikagul J., Dalsgaard A., Chai J.Y., Sohn W.M., Murrell K. D. Fishborne zoonotic intestinal trematodes, Vietnam // *Emerg. Infect. Dis.* 2007. Vol. 13. P. 1828-1833.
69. Dybdahl M.F., Lively C.M. The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite // *Evolution*. 1996. Vol. 50. P. 2264-2275.
70. Ebert D. Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite // *Science*. 1994. Vol. 256. P. 1084-1086.
71. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform.* 2007. Vol. 1. P. 47-50.
72. Excoffier L., Schneider S. Why hunter-gatherer populations do not show signs of pleistocene demographic expansions // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96. P. 10597-10602.
73. Eyre-Walker A. Do mitochondrial genome recombine in humans? // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2000. Vol. 355. P. 1573-1580.
74. Fried B., Graczyk T.K., Tamang L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans // *Parasitol. Res.* 2004. Vol. 93. P. 159-170.
75. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics*. 1997. Vol. 147. N 2. P. 915-925.
76. Fürst T., Keiser J., Utzinger J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* 2012. Vol. 12. P. 210-221.

77. Gandon S., Capoweiz Y., Dubois Y., Michalakis Y., Olivieri I. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1996. Vol. 263. P. 1003-1009.
78. Gandon S., Michalakis Y. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time // J. Evol. Biol. 2002. Vol. 15. P. 451-462.
79. Gottschling M., Plötner J. Secondary structure models of the nuclear internal transcribed spacer regions and 5.8S rRNA in Calcionelloideae (Peridiniaceae) and other dinoflagellates // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32. P. 307-315.
80. Gower C.M., Gouvras A.N., Lamberton P.H.L., Deol A., Shrivastava J., Mutombo P.N., Mbuh J.V., Norton A.J., Webster B.L., Stothard J.R., Garba A., Lamine M.S., Kariuki C., Lange C.N., Mkoji G.M., Kabatereine N.B., Gabrielli A.F., Rudge J.W., Fenwick A., Sacko M., Dembelé R., Lwambo N.J.S., Tchuem Tchuente L.-A., Rollinson D., Webster J.P. Population genetic structure of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* from a cross six sub-Saharan African countries: implications for epidemiology, evolution and control // Acta Trop. 2013. Vol. 28. P. 261-274.
81. Grove D.I. A history of human helminthology. – Wallingford, Oxon: C.A.B. International, 1990. – 848 p.
82. Gupta M., Verma B., Kumar N., Chahota R.K., Rathour R., Sharma S.K., Bhatia S., Sharma T.R. Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers // J. Genet. 2012. Vol. 91. N 3. P. 279-287.
83. Hahn C., Fromm B., Bachmann L. Comparative genomics of flatworms (Platyhelminthes) reveals shared genomic features of ecto- and endoparasitic Neodermata // Genome Biol. Evol. 2014. Vol. 6. N 5. P. 1105-1117.
84. Hamidinejat H., Moetamedi H., Alborzi A., Hatami A. Molecular detection of *Sarcocystis* species in slaughtered sheep by PCR-RFLP from south-western of Iran // J. Parasit. Dis. 2014. Vol. 38. N 2. P. 233-237.
85. 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.

86. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. Vol. 22. P. 160-174.
87. Hashimoto K., Watanobe T., Liu C.X., Init I., Blair D., Ohnishi S., Agatsuma T. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola* species is *F. gigantica* // *Parasitol. Res.* 1997. Vol. 83. P. 220-225.
88. Hewitt G.M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation // *Biol. J. Linn. Soc.* 1996. Vol. 58. P. 247-276.
89. Hewitt G.M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages // *Nature.* 2000. Vol. 405. P. 907-913.
90. Hong S-T., Fang Y. *C. sinensis* and clonorchiasis, an update // *Parasitol. Int.* 2012. Vol. 61. P. 17-24.
91. Hop N.T., De N.V., Murrell D., Dalsgaard A. Occurrence and species distribution of fishborne zoonotic trematodes in wastewater-fed aquaculture in northern Vietnam // *Trop. Med. Int. Health.* 2007. Vol. 2. P. 66-72.
92. Hung N.M., Madsen H., Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans // *Acta Parasitol.* 2013a. Vol. 58. P. 231-258.
93. Hung N.M., Stauffer J. R., Madsen H. Prey species and size choice of the molluscivorous fish, black carp (*Mylopharyngodon piceus*) // *J. Freshwater Ecol.* 2013b. Vol. 28. N 4. P. 547-560.
94. Huo J., Yang G., Zhang Y., Li F. A new strategy for identification of currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAPD markers // *Genet. Mol. Res.* 2013. Vol. 12. N 2. P. 2056-2067.
95. Jarne P., Theron A. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: a practical approach and review // *Parasitology.* 2001. Vol. 123. P. S27-S40.
96. Jensen J.L., Bohonak A.J., Kelley S.T. Isolation by distance, web service // *BMC Genet.* 2005. Vol. 6. P. 13. v.3.23.
97. 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) // *Mol. Ecol.* 2002. Vol. 11. P. 25-38.

98. Kang S., Sultana T., Loktev V.B., Wongratanacheewin S., Sohn W.-M., Eom K.S., Park J.-K. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda) // *Parasitol. Int.* 2008. Vol. 57. P. 191-197.
99. Kang T.H., Yun D.H., Lee E.H., Chung Y.B., Bae Y.A., Chung J.Y., Kang I., Kim J., Cho S.Y., Kong Y. A cathepsin F of adult *Clonorchis sinensis* and its phylogenetic conservation in trematodes // *Parasitology*. 2004. Vol. 128. P. 195-207.
100. Keeney D.B., Waters J.M., Poulin R. Diversity of trematode genetic clones within amphipods and the timing of same-clone infections // *Int. J. Parasitol.* 2007. Vol. 37. P. 351-357.
101. Keiser J., Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis // *Emerg InfectDis.* 2005. Vol. 11. P. 1507-1514.
102. Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis // *Clin. Microbiol. Rev.* 2009. Vol. 22. P. 466-483.
103. Kim T.Y., Cho P.Y., Na J.W., Hong S.J. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Clonorchis sinensis* elongation factor-1 α // *Parasitol. Res.* 2007. Vol. 101. N 6. P. 1557-1562.
104. Köhler 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) // *Parasitol. Res.* 2006. Vol. 98. P. 86-93.
105. Komiya Y., Suzuki N. Biology of *Clonorchis sinensis* // *Prog. Med. Parasitol. Jpn.* 1964. Vol. 1. P. 553-600.
106. Korsunen A., Chrisanfova G., Lopatkin A., Beer S.A., Voronin M., Ryskov A.P., Semyenova S.K. Genetic differentiation of cercariae infrapopulations of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati* based on RAPD markers and mitochondrial *cox1* gene // *Parasitol. Res.* 2012. Vol. 110. N 2. P. 833-841.
107. Králová-Hromadová I., Štefka J., Špakulová M., Orosová M., Bombarová M., Hanzelová V., Bazsalovicsová E., Scholz T. Intra-individual internal transcribed spacer 1 (ITS1) and ITS2 ribosomal sequence variation linked with multiple rDNA loci:

a case of triploid *Atractolytocestus huronensis*, the monozoic cestode of common carp // Int. J. Parasitol. 2010. Vol. 40. P. 175-181.

108. Lai D.H., Wang Q.P., Chen W., Cai L.S., Wu Z.D., Zhu X.Q., Lun Z.R. Molecular genetic profiles among individual *Clonorchis sinensis* adults collected from cats in two geographic regions of China revealed by RAPD and MGE-PCR methods // Acta Trop. 2008. Vol. 107. P. 213-216.

109. Le T.H., Blair D., McManus D.P. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda) // Parasitology. 2001. Vol. 123. N 6. P. 609-621.

110. Le T.H., Blair D., McManus D.P. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms // Trends Parasitol. 2002a. Vol. 18. P. 206-213.

111. Le T.H., McManus D.P., Blair D. Codon usage and bias in mitochondrial genomes of parasitic platyhelminthes // Korean J. Parasitol. 2004. Vol. 42. P. 159-167.

112. 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. 2002b. Vol. 124. P. 97-112.

113. Lee D., Choe S., Park H., Jeon H.K., Chai J.Y., Sohn W.M., Yong T.S., Min D.Y., Rim H.J., Eom K.S. Complete mitochondrial genome of *Haplorchis taichui* and comparative analysis with other trematodes // Korean J. Parasitol. 2013. Vol. 51. N 6. P. 719-726.

114. Lee J.H., Rim H.J., Bak U.B. Effect of *Clonorchis sinensis* infection and dimethylnitrosamine administration on the introduction of cholangiocarcinoma in Syrian golden hamsters // Korean J. Parasitol. 1993. Vol. 31. P. 21-30.

115. Lee J.H., Yang H.M., Buk U.B., Rim H.J. Promotion role of *Clonorchis sinensis* infection on introduction of cholangiocarcinoma during two-step carcinogenesis // Korean J. Parasitol. 1994. Vol. 32. P. 15-18.

116. Lee S.U., Chun H.C., and Huh S. Molecular phylogeny of parasitic Platyhelminthes based on sequences of partial 28S rDNA D1 and mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I // Korean J. Parasitol. 2007. Vol. 45. P. 181-189.

117. Lee S.U., Huh S. Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of *Clonorchis sinensis* // Korean J. Parasitol. 2004. Vol. 42. P. 145-148.
118. Lei F., Qu Y., Lu J., Liu Y., Yin Z. Conservation on diversity and distribution patterns of endemic birds in China // Biodivers. Conserv. 2003. Vol. 12. P. 239-254.
119. Li J.J., Wen S.X., Zhang Q.S., Wang F.B., Zheng B.X., Li B.Y. A discussion on the period, amplitude and type of the uplift of the Qinghai-Xizang Plateau // Sci. Sin. 1979. Vol. 22. P. 1314-1328 (in Chinese with English abstract).
120. Li S., Hong S.J., Choi M.H., Hong S.T. Identification of two β -tubulin isotypes of *Clonorchis sinensis* // Parasitol. Res. 2009. Vol. 105. N 4. P. 1015-1021.
121. Li M., Shi S.F., Brown C.L., Yang T.B. Phylogeographical pattern of *Mazocraeoides gonialosae* (Monogenea, Mazocraeidae) on the dotted gizzard shad, *Konosirus punctatus*, along the coast China // Int. J. Parasitol. 2011. Vol. 41. P. 1263-1272.
122. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451-1452.
123. Liu D., Shi Y., Wang R., Zhao Q., Jian Z., Cheng X., Wang P., Wang S., Yuan B., Wu X., Zhangxiang Q., Qinq X., Wanbo H., Weiwen H., Zhisheng A., Huayu L. Table of the Chinese stratigraphic correlation remarked with climate change // Quat. Sci. 2000. Vol. 20. P. 108-128.
124. Liu G.H., Li B., Li J.Y., Song H.Q., Lin R.Q., Cai X.Q., Zou F.C., Yan H.K., Yuan Z.G., Zhou D.H., Zhu X.Q. Genetic variation among *Clonorchis sinensis* isolates from different geographic regions in China revealed by sequence analyses of four mitochondrial genes // J. Helminthol. 2012. Vol. 86. P. 479-484.
125. Liu J., Jiang J.M., Chen Y.T. Genetic diversity of central and peripheral populations of *Toona ciliata* var. *pubescens*, an endangered tree species endemic to China // Genet. Mol. Res. 2014. Vol. 13. N 2. P. 4579-4590.
126. Liu J.Q., Ni Y.Y., Chu G.Q. Main palaeoclimatic events in the Quaternary // Quat. Sci. 2001. Vol. 21. P. 239-248.

127. Liu W.Q., Liu J., Zhang J.H., Long X.C., Lei J.H., Li Y.L. Comparison of ancient and modern *Clonorchis sinensis* based on ITS1 and ITS2 sequences // *Acta Trop.* 2007. Vol. 101. P. 91-94.
128. Lively C.M. Migration, virulence, and the geographic mosaic of adaptation by parasites // *Am. Nat.* 1999. Vol. 153. P. S34-S47.
129. Lively C.M., Dybdahl M.F. Parasite adaptation to locally common host genotypes // *Nature.* 2000. Vol. 405. P. 679-681.
130. Louhi K.-R., Karvonen A., Rellstab C., Jokela J. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? // *Infect. Genet. Evol.* 2010. Vol. 10. P. 1271-1277.
131. Lun Z.R., Gasser R.B., Lai D.H., Li A.X., Zhu X.Q., Yu X.B., Fang Y.Y. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China // *Lancet Infect. Dis.* 2005. Vol. 5. P. 31-41.
132. Ma H., Overstreet R.M., Subbotin S.A. ITS2 secondary structure and phylogeny of cyst-forming nematodes of the genus *Heterodera* (Tylenchida: Heteroderidae) // *Science Direct.* 2008. Vol. 8. P. 182-193.
133. Madesis P., Abraham E.M., Kalivas A., Ganopoulos I., Tsaftaris A. Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L. populations revealed by morphological and microsatellite-based (SSR/ISSR) markers // *Genet. Mol. Res.* 2014. Vol. 13. N. 2. P. 4226-4240.
134. Mas-Coma S., Bargues M.D. Human liver flukes: a review // *Res. Rev. Parasitol.* 1997. Vol. 57. P. 145-218.
135. Mavárez J., Pointier J.-P., David P., Delay B., Jarne P. Genetic differentiation, dispersal and mating system in the schistosome-transmitting freshwater snail *Biomphalaria glabrata* // *Heredity.* 2002. Vol. 89. P. 258-265.
136. 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* // *J. Evol. Biol.* 2001. Vol. 14. P. 395-405.
137. Minárik G., Bazsalovicsová E., Zvijáková L., Stefka J., Pálková L., Králová-Hromadová I. Development and characterization of multiplex panels of

polymorphic microsatellite loci in giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), using next-generation sequencing approach // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2014. Vol. 195. N 1. P. 30-33.

138. Morgan J.A., Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group // *Parasitology.* 1995. Vol. 111. P. 609-615.

139. Morgan J.A., Blair D. Trematode and monogenean rRNA ITS2 secondary structures support a four-domain model // *J. Mol. Evol.* 1998. Vol. 47. N 4. P. 406-419.

140. Murray E.W., Giles A.R., Lillicrap D. Germ-line mosaicism for a valine-to-methionine substitution at residue 553 in the glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand factor, causing type IIB von Willebrand disease // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. Vol. 50. P. 199-207.

141. Nei M. *Molecular evolutionary genetics.* – USA: Columbia University Press, New York. 1987. – 512 p.

142. Nesbø C.L., Arab M.O., Jakobsen K.S. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*) // *Genetics.* 1998. Vol. 148. N 4. P. 1907-1119.

143. Nontasut P., Thong T.V., Waikagul J., Anantaphruti M.T., Fungladda W., Imamee N., De N.V. Social and behavioral factors associated with *Clonorchis* infection in one commune located in the Red river delta of Vietnam // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2003. Vol. 34. N 2. P. 269-273.

144. Obbard D.J., Jiggins F.M., Halligan D.L., Little T.J. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16. P. 580-585.

145. Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) // *Int. J. Parasitol.* 2003. Vol. 33. P. 733-755.

146. Olson P.D., Tkach V.V. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes // *Advances in Parasitol.* 2005. Vol. 60. P. 165-243.

147. Painter J.N., Siitonen J., Hanski I. Phylogeographical patterns and genetic diversity in three species of Eurasian boreal forest beetles // *Biol. J. Linn. Soc.* 2007. Vol. 91. P. 267-279.
148. Park G.M. Genetic comparison of liver flukes, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, based on rDNA and mtDNA gene sequences // *Parasitol. Res.* 2007. Vol. 100. P. 351-357.
149. Park G.M., Yong T.S. Geographical variation of the liver fluke, *Clonorchis sinensis*, from Korea and China based on the karyotypes, zymodeme and DNA sequences // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2001. Vol. 32. N 2. P. 12-16.
150. Paterson S., Vogwill T., Buckling A., Benmayor R., Spiers A.J., Thomson N.R., Quail M., Smith F., Walker D., Libberton B., Fenton A., Hall N., Brockhurst M.A. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution // *Nature.* 2010. Vol. 464. P. 275-278.
151. Peters A.D., Lively C.M. The Red Queen and actuating epistasis: a population genetic analysis of antagonistic coevolution // *Am. Nat.* 1999. Vol. 154. P. 393-405.
152. Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* // *Int. J. Parasitol.* 2013. Vol. 43. P. 1031-1046.
153. Piganeau G., Gardner M., Eyre-Walker A. A broad survey of recombination in animal mitochondria // *Mol. Biol. Evol.* 2004. Vol. 21. N 12. P. 2319-2325.
154. Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Guselnikov S., Vasiliev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. Adult *Opisthorchis felinus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* // *Exp. Parasitol.* 2013. Vol. 135. N 2. P. 297-306.
155. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics.* 1998. Vol. 14. N 9. P. 817-818.

156. Prasad P.K., Tandon V., Biswal D.K., Goswami L.M., Chatterjee A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures and sequence motifs of ITS2 rDNA of *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 (Digenea: Paragonimidae) and related species // BMC Genomics. 2009. Vol. 10. N 3. S25.
157. Prugnolle F., Liu H., de Meeus T., Balloux F. Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes // Int. J. Parasitol. 2005a. Vol. 35. P. 255-263.
158. Prugnolle F., Theron A., Pointier J.P., Jabbourn-Zahab R., Jarne P., Durand, P., de Meeu T. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts and its consequence for local adaptation // Evolution. 2005b. Vol. 50. P. 296-303.
159. Qian M.B., Chen Y.D., Liang S., Yang G.J., Zhou X.N. The global epidemiology of clonorchiasis and its relation with cholangiocarcinoma // Infect. Dis. Poverty. 2012. Vol. 1. P. 4.
160. Qiu Y.-X., Fu C.-X., Comes H.P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora // Mol. Phylogen. Evol. 2011. Vol. 59. P. 225-244.
161. Ramírez J.D., Duque M.C., Montilla M., Cucunubá Z.M., Guhl F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern // Infect. Genet. Evol. 2012. Vol. 12. N 8. P. 1743-1750.
162. Raymond M., Rousset F. An exact test for population differentiation // Evolution. 1995. Vol. 49. P. 1283-1286.
163. Riad N.H., Taha H.A., Mahmoud Y.I. Effects of garlic on *Schistosoma mansoni* harbored in albino mice: molecular characterization of the host and parasite // Gene. 2013. Vol. 518. N 2. P. 287-291.
164. Rim H.J. The current pathobiology and chemotherapy of clonorchiasis // Korean J. Parasitol. 1986. Vol. 24. P. 1-141.
165. Rodriguez-Martinez A.B., Garrido J.M., Zarranz J.J., Arteagoitia J.M., de Pancorbo M.M., Atares B., Bilbao M.J., Ferrer I., Juste R.A. A novel form of human

disease with a protease-sensitive prion protein and heterozygosity methionine/valine at codon 129: case report // BMC Neurol. 2010. Vol. 10. P. 99.

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

167. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Mol. Biol. Evol. 1992. Vol. 9. N 3. P. 552-569.

168. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. Vol. 19. P. 1572-1574.

169. Rooney A.P. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21. P. 1704-1711.

170. Rosselló J.A., Lázaro A., Cosin R., Molins A. A phylogenetic split in *Buxus balearica* (Buxaceae) as evidenced by nuclear ribosomal markers: when ITS paralogues are welcome // J.Mol. Evol. 2007. Vol. 64. P. 143-157.

171. Rudge J.W., Carabin H., Balolong E., Tallo V., Shrivastava J., Lu D.-B., Basáñez M.-G., Olveda R., McGarvey S.T., Webster J.P. Population genetics of *Schistosoma japonicum* with the Philippines suggest high levels of transmission between human and dogs // PLoS Negl. Trop. Dis. 2008. Vol. 2. e340.

172. Rudge J.W., Lu D.-B., Fang G.-R., Wang T.-P., Basáñez M.-G., Webster J.P. Parasite genetic differentiation by habitat type and host species: molecular epidemiology of *Schistosoma japonicum* in hilly and marshland areas of Anhui province // China Mol. Ecol. 2009. Vol. 18. P. 2134-2147.

173. Saijuntha W., Sithithaworn P., Wongkham S., Laha T., Chilton N.B., Petney T.N., Barton M., Andrews R.H. Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR, and phylogenetic relationships with other trematodes // Parasitology. 2008. Vol. 135. P. 1479-1486.

174. Sakka H., Quere J.-P., Kartavtseva I.V., Pavlenko M.V., Chelomina G.N., Atopkin D.M., Bogdanov A.S., Michaux, J. Comparative phylogeography of four

Apodemus species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure // Biol. J. Linn. Soc. 2010. Vol. 100. P. 797-821.

175. Scheffler I.E. Mitochondria (Second Edition). – USA, New York: John Wiley and Sons Inc., 2007. – 484 p.

176. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig D., Pesber W., Laffe C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples // Diagn. Micr. Infec. Dis. 2001. Vol. 47. P. 349-358.

177. Semyenova S.K., Morozova E.V., Khrisanfova G.G., Asatrian A.M., Movsessian S.O., Ryskov A.P. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica* // Acta Parasitol. 2003. Vol. 48. P. 125-130.

178. Shadel G.S., Clayton D.A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates // Annu. Rev. Biochem. 1997. Vol. 66. P. 409-435.

179. Shalaby H.A., El-Moghazy F.M., Khalil F.A.M. Specificity of snail derived antigens in diagnosis of their trematode parasites // Res. J. Parasitol. 2010. Vol. 5. P. 224-230.

180. 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). // Parasitol. Int. 2010. Vol. 59. N 1. P. 100-103.

181. Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Romanov K.V., Besprozvannykh V.V., Fedorov K.P., Yurlova N.I., Serbina E.A., Sithithaworn P., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda) // Parasitol. Res. 2009. Vol. 106. P. 293-297.

182. Sherrard-Smith E., Chadwick E.A., Cable J. Climate variables are associated with the prevalence of trematodes in otter // Int. J. Parasitol. 2013. Vol. 43. P. 729-737.

183. Sire C., Durand P., Pointier J.-P., Theron A. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*):

infrapopulation differentiation at microspatial scale // *Int. J. Parasitol.* 2001. Vol. 31. P. 1609-1616.

184. Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations // *Science*. 1987. Vol. 236. P. 787-792.

185. Stauffer W.M., Sellman J.S., Walker P.F. Biliary liver flukes (Opisthorchiasis and Clonorchiasis) in immigrants in the United States: often subtle and diagnosed years after arrival // *J. Travel Med.* 2004. Vol. 11. P. 157-159.

186. Subbotin S., Deimi A.M., Zheng J., Chizhov V.N. Length variation and repetitive sequences of internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene, diagnostics and relationships of populations of potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (Tylenchida: Anguinidae) // *Nematology*. 2011. Vol. 13. P. 773-785.

187. Subbotin S., Sturhan D., Vovlas N., Castillo P., Tamber J.T, Moens M., Baldwin J.G. Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family Hoplolaimidae Filipjev, 1934 // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. Vol. 43. P. 881-890.

188. 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., Xinbing Y. Low divergence of *Clonorchis sinensis* in China based on multilocus analysis. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 6. e67006.

189. Sun J., Xu J., Liang P., Mao Q., Huang Y., Lv X., Deng C., Liang C., de Hoog G.S., Xinbing Y. Molecular identification of *Clonorchis sinensis* and discrimination with other opisthorchid liver fluke species using multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) // *Parasit. Vectors*. 2011. Vol. 4. P. 98.

190. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). – USA, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

191. Tajima F. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations // *Genetics*. 1983. Vol. 105. P. 437-467.

192. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. Vol. 123. N 3. P. 585-595.

193. Tatonova Y.V., Chelomina G.N., Besprosvannykh V.V. Genetic diversity of nuclear ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchiidae) from the Russian Far East // *Parasitol. Int.* 2012. Vol. 61. N 4. P. 664-674.
194. 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 Parasit. (Praha)*. 2013. Vol. 60. N 2. P. 155-162.
195. Thaenkham U., Blair D., Nawa Y., Waikagul J. Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: are they distinct? // *Parasitol. Int.* 2012. Vol. 61. N 1. P. 90-93.
196. Theron A., Sire C., Rognon A., Prugnolle F., Durand P. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts // *Parasitology*. 2004. Vol. 129. P. 571-585.
197. Tinga N., De N., Vien H.V., Chau L., Toan N.D., Kager P.A., Vries P.J. Little effect of praziquantel or artemisinin on clonorchiasis in northern Vietnam. A pilot study // *Trop. Med. Int. Health*. 1999. Vol. 4. P. 814-818.
198. 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) // *Biotechniques*. 2000. Vol. 29. P. 52-54.
199. Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å // *Science*. 1996. Vol. 272. N 5265. P. 1136-1144.
200. van Dijk J., Sargison N.D., Kenyon F., Skuce P.G. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions // *Animal*. 2010. Vol. 4. P. 377-392.
201. van Herwerden L., Blair D., Agatsuma T. Intra- and inter-specific variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetic studies // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999. Vol. 12. P. 67-73.

202. van Herwerden L., Blair D., Agatsuma T. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex // *Parasitology*. 1998. Vol. 116. P. 311-317.
203. van Herwerden L., Caley M.J., Blair D. Regulatory motifs are present in the ITS1 of some flatworm species // *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2003. Vol. 296. N 1. P. 80-86.
204. van Herwerden L., Gasser R.B., Blair D. ITS1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus* // *Int. J. Parasitol.* 2000. Vol. 30. P. 157-169.
205. van Valen L. A new evolutionary law // *Evol. Theor.* 1973. Vol. 1. P. 1-30.
206. Vawter L., Brown W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock // *Science*. 1986. Vol. 234. N 4773. P. 194-196.
207. 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.
208. von der Schulenburg J.H.G., English U., Wägele J.W. Evolution of ITS rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 3' end sequence conservation and its phylogenetic utility // *J. Mol. Evol.* 1999. Vol. 48. P. 2-12.
209. von der Schulenburg J.H.G., Hancock J.M., Pagnamenta A., Sloggett J.J., Majerus M.E.N., Hurst G.D.D. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18. P. 648-660.
210. Wang B., Jiang J., Xie F., Li C. Phylogeographic patterns of mtDNA variation revealed multiple glacial refugia for the frog species *Feirana taihangnica* endemic to the Qinling Mountains // *J. Mol. Evol.* 2013. Vol. 76. P. 112-128.
211. Wang S., Bao Z., Li N., Zhang L., Hu J. Analysis of the secondary structure of ITS1 in Pectinidae: implications for phylogenetic reconstruction and structural evolution // *Mar. Biotechnol.* 2007. Vol. 9. P. 231-242.

212. 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 // Int. J. Parasitol. 2006. Vol. 36. P. 1317-1325.
213. Wang W.T. On some distribution patterns and some migration routes found in the Eastern Asiatic region (cont.) // Acta Phytotaxonomica Sin. 1992. Vol. 30. P. 97-117.
214. Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J., Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis* // Genome Biol. 2011. Vol. 12. N 10. R107.
215. Warberg R., Jensen K.T., Frydenberg J. Repetitive sequences in the ITS1 region of ribosomal DNA in congeneric microphallid species (Trematoda: Digenea) // Parasitol. Res. 2005. Vol. 97. P. 420-423.
216. Weaver P.L., Sun C., Chang T.H. Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3 // Mol. Cell. Biol. 1997. Vol. 17. P. 1354-1365.
217. WHO. Control of foodborne trematode infections. Report of a WHO Study Group // World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 1995. Vol. 849. P. 1-157.
218. Wide A., Capaldo J., Zerpa N., Pabon R., Noda A., Noya B., González J., Noya O. Sharing of antigens between *Plasmodium falciparum* and *Anopheles albimanus* // Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2006. Vol. 48. P. 327-332.
219. Wright J.M., Bentzen P. Microsatellites: genetic markers for the future // Rev. Fish. Biol. Fisher. 1994. Vol. 4. N 3. P. 384-388.
220. Xiao J.Y., Gao J.F., Cai L.S., Dai Y., Yang C.J., Luo L., Agatsuma T., Wang C.R. Genetic variation among *Clonorchis sinensis* isolates from different hosts and geographical locations revealed by sequence analysis of mitochondrial and ribosomal DNA regions // Mitochondrial DNA. 2013. Vol. 24. N 5. P. 559-564.
221. Xu M.J., Liu Q., Nisbet A.J., Cai X.Q., Yan C., Lin R.Q., Yuan Z.G., Song H.Q., He X.H., Zhu X.Q. Identification and characterization of microRNAs in

Clonorchis sinensis of human health significance // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 521.

222. Yan H.B., Wang X.Y., Lou Z.Z., Li L., Blair D., Yin H., Cai J.Z., Dai X.L., Lei M.T., Zhu X.Q., Cai X.P., Jia W.Z. The mitochondrial genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the first representative for the family Paramphistomidae // PLoS One. 2013. Vol. 8. N 8. e71300.

223. Yoshida Y. Clonorchiasis – a historical review of contributions of Japanese parasitologists // Parasitol. Int. 2012. Vol. 61. P. 5-9.

224. You Y., Sun K., Xu L., Wang L., Jiang T., Liu S., Lu G., Berquist S.W., Feng J. Pleistocene glacial cycle effects on the phylogeography of the Chinese endemic bat species, *Myotis davidii* // BMC Evol. Biol. 2010. Vol. 10. P. 208-219.

225. Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Rubtsov N.B. Comparative cytogenetics of five species of the family Opistorchiidae // Parasitol. Int. 2012. Vol. 1. P. 87-89.

226. Zheng B., Xu Q., Shen Y. The relationship between climate change and Quaternary glacial cycles on the Qinghai-Tibetan Plateau: review and speculation // Quat. Int. 2002. Vol. 97-98. P. 93-101.

227. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 3406-3415.

228. <http://ugene.unipro.ru>

229. www.fibozoparia1.org