

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
НАЗЕМНОЙ БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ»
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ФНЦ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ДВО РАН)

На правах рукописи

Шуменко
Полина Геннадьевна

**Видовая идентификация, филогенетические связи и особенности
популяционной структуры *Metagonimus Katsurada, 1912* (Trematoda:
Heterophyidae) Дальнего Востока России**

1.5.12. Зоология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Татонова Юлия Викторовна

г. Владивосток

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛОССАРИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>METAGONIMUS</i> И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭТОГО МЕТОДЫ	11
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	19
2.1. Получение паразитологического материала	19
2.2 Исследование морфологии.....	21
2.3 Сканирующая электронная микроскопия.....	22
2.4 Выделение геномной ДНК	22
2.5 Получение последовательностей ДНК	23
2.6. Филогенетический анализ	26
2.7. Популяционный анализ	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1. Морфологические и генетические данные для представителей рода <i>Metagonimus</i>	34
3.2. Обоснование валидности дальневосточных представителей рода <i>Metagonimus</i>	49
3.3. Филогенетические отношения внутри рода <i>Metagonimus</i>	58
3.4. Ареалы представителей рода <i>Metagonimus</i> на континентальной части Восточной Азии.....	65
3.5. Современная структура популяции <i>Metagonimus suifunensis</i> и ее формирование.....	67
3.6. Эпидемиология метагонимоза	97
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	103

ГЛОССАРИЙ

Анцестральный (предковый) гаплотип – гаплотип основателя, имеющий более древнее происхождение (Харьков, 2012).

Гаплогруппа – группа гаплотипов, имеющих общего предка, у которого произошла мутация, унаследованная всеми потомками.

Граница между субпопуляциями – водораздел между бассейнами озера Ханка и реки Амур, который, предположительно, ограничил миграцию хозяев.

Корея – Республика Корея.

Популяция – относительно изолированная и способная к саморегуляции группа особей одного вида, длительно обитающих на общей территории, свободно скрещивающихся между собой и дающих плодовитое потомство. В настоящей работе термин «популяция» применяется к популяции, включающей все образцы, использованные в анализе.

Субпопуляция – группа скрещивающихся между собой особей с сильно ограниченной миграцией. Названия рек соответствует названию локалитетов и субпопуляций, указанных в главе «Результаты и обсуждение».

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Восточноазиатский регион, частью которого является юг Дальнего Востока (ДВ) России, включает области, где наиболее широко представлены возбудители разных зоонозов. В силу исторических особенностей формирования фауны юга ДВ, на этой территории России наиболее богато представлено видовое разнообразие паразитических червей, имеющих эпидемиологическое значение. К настоящему моменту здесь зарегистрировано более 40 видов, числящихся как паразиты человека, и более 70 потенциальных паразитов человека (Ермоленко и др., 2020). Среди паразитических червей наибольшее эпидемиологическое значение для региона имеют представители родов *Centrocestus* Looss, 1899, *Metagonimus* Katsurada, 1912, *Clonorchis* Looss, 1907, *Nanophyetus* Chapin, 1927 и *Paragonimus* Braun, 1899 (последние четыре входят в список СанПиН 3.2.1333-03) и др. (Беспрозванных, Ермоленко, 2005; Ермоленко и др., 2020; Tatonova et al., 2012; Voronova et al., 2016). При этом, как показали последние исследования, некоторые из представителей перечисленных родов, в частности виды рода *Nanophyetus*, являются эндемиками юга ДВ России (Voronova et al., 2016). Проблема гельминтозных инвазий человека достаточно актуальна в свете их высокой значимости в рамках системы здравоохранения, то есть изучение этих паразитов имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку инфекционные болезни негативно влияют на трудоспособность населения и приводят, в конечном итоге, к экономическим потерям.

К сожалению, на сегодняшний день информация о видовом составе, распространении и особенностях биологии возбудителей природноочаговых гельминтозов, как дальневосточного, так и в целом восточноазиатского региона, представлена не в полном объеме. Поэтому требуются комплексные исследования для отдельных регионов, включающие получение данных о видовом разнообразии возбудителей зоонозов, основанном на морфологических и молекулярных показателях, а также особенностях

циркуляции паразитов. Только основываясь на таком подходе в исследованиях можно получить достоверную информацию о видовом составе региональных фаун, как паразитов в целом, так и возбудителей зоонозов. В свете того, что морфологически, а во многих случаях и генетически, сходные близкородственные паразитические черви могут иметь различия как в локализации в хозяине и патогенезе, так и, соответственно, в проявлении симптомов заболевания, видовая идентификация возбудителей – это один из важных моментов, обеспечивающих возможность адекватной диагностики паразитозов.

Более того, уточнение видового статуса паразитов с использованием комплексного подхода позволяет разрабатывать современные ПЦР-диагностикумы для видов, циркулирующих на определенной территории. Это необходимо, поскольку яйца трематод разных видов трудноотличимы и даже идентичны. Кроме копрологических методов в диагностике также можно использовать иммуноферментный анализ, но в случае хронической инвазии антитела присутствуют в следовых концентрациях, либо их и вовсе не обнаруживают (Чуелов, Россина, 2020). В таких ситуациях с целью постановки верного диагноза необходимо использовать ПЦР с праймерами к специфическим нуклеотидным последовательностям (ПЦР-диагностикумы), но это возможно только, если известен перечень всех видов на территории. Таким образом, получение информации о видовом составе и распространении гельминтов региона обеспечивает условия для планового мониторинга очагов зоонозов и контроля возможной экспансии паразитов.

К одним из достаточно широко распространенных в восточноазиатском регионе возбудителей инфекций относятся трематоды рода *Metagonimus*, которые, как считают Чай и Джунг (Chai, Jung 2018), являются недостаточно изученной группой паразитов. В составе рода до начала настоящего исследования числились 8 видов: *Metagonimus yokogawai* Katsurada, 1912, *M. takahashii* Suzuki, 1930, *M. miyatai* Saito, Chai, Kim, Lee & Rim, 1997, *M. hakubaensis* Shimazu, 1999, *M. katsuradai* Izumi, 1935, *M. otsurui* Shimazu &

Urabe, 2002, *M. minutus* Katzuta, 1932 и *M. ovatus* Yokogawa, 1913. Три вида этого рода – *M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai*, известны как возбудители метагонимоза человека и включены в список наиболее важных паразитов в мире, передающихся через продукты питания (Chai et al., 2005; Pornruseetairatn et al., 2016). Из перечисленных видов *Metagonimus*, *M. yokogawai* и *M. katsuradai* были зарегистрированы на территории юга ДВ России. Видовая принадлежность этих червей была обоснована на данных морфологии половозрелых особей, церкарий и сведений о жизненных циклах червей (Скрябин и др., 1930; Шатров, 1974; Беспрозванных и др., 1987; Беспрозванных и др., 2012; Чертов, 2013).

В последнее время опубликованные результаты исследований свидетельствуют о том, что одних морфологических характеристик недостаточно для дифференциации близкородственных трематод. Это относится и к молекулярным данным, полученным без подтверждения на морфологическом уровне таксономического статуса трематод (Lee et al., 2004; Thaenkham et al., 2012). Исходя из сказанного, для объективной оценки видовой принадлежности метагонимусов юга ДВ России, мы использовали комплексный подход в исследованиях, а именно изучение в едином эксперименте морфологии стадий развития и молекулярных характеристик червей обозначенного рода. Такой подход в исследованиях позволил пересмотреть видовой статус червей *Metagonimus* юга ДВ России. Помимо этого, для представителей рода были получены данные о генетическом разнообразии и популяционной структуре, что обеспечило информацией для моделирования исторических путей становления дальневосточной популяции и прогнозирования возможной ее трансформации.

Степень разработанности. До настоящего исследования на юге Дальнего Востока на основании морфологии разных стадий развития трематод было установлено наличие двух видов *Metagonimus*, обозначенных как *M. yokogawai* и *M. katsuradai*. Наряду с этим, для этих трематод были получены данные по их жизненным циклам, составу хозяев и

распространению в пределах юга ДВ России (Скрябин и др., 1930; Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных, 2000; Беспрозванных, Ермоленко, 2005; Беспрозванных и др., 2013; Чертов и др., 2013). При этом видовой статус червей не был подтвержден на молекулярном уровне, и, следовательно, не были проанализированы филогенетические связи с другими видами рода, а также не изучены особенности формирования и структуры популяции и ряд других характеристик, основывающихся на генетических данных.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение морфологических и генетических особенностей представителей рода *Metagonimus*, циркулирующих на территории юга Дальнего Востока России.

Основные задачи исследования:

1. Установить видовую принадлежность дальневосточных представителей рода *Metagonimus* на основании их морфологических и молекулярно-генетических характеристик.

2. Проанализировать филогенетические связи представителей рода *Metagonimus* с использованием последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК.

3. Выявить особенности популяционной структуры дальневосточных метагонимусов на основе полноразмерных митохондриальных генов (*cox1*, *cytb* и *nad1*).

Научная новизна. С применением комплексного подхода, включающего изучение морфологии трематод, а также получение молекулярно-генетических данных, установлено, что черви юга ДВ России, известные ранее как *M. yokogawai* и *M. katuradai*, принадлежат новым видам, обозначенным нами соответственно *M. suifunensis* Shumenko, Tatonova & Besprozvannykh, 2017 и *M. pusillus* Tatonova, Shumenko & Besprozvannykh, 2018. Впервые проведен популяционный анализ для одного из представителей рода *Metagonimus* юга ДВ России. На основании анализа комбинированных данных по митохондриальным маркерам для *M. suifunensis* впервые среди представителей рода *Metagonimus* разработан возможный

сценарий эволюционных процессов внутри популяции паразита. Проведенное исследование выявило подразделение популяции на северную и южную группы. Кроме того, наличие большего разнообразия гаплотипов в пределах северной группы, а также включение образцов из Хабаровского края в анцестральный гаплотип позволило обозначить этот район как вероятный центр формирования популяции *M. suifunensis*, а выявление южных гаплотипов в северных локалитетах сделало возможным моделирование маршрутов миграции паразита в пределах юга дальневосточного региона России.

Теоретическая и практическая значимость. Выявлено, что на территории юга ДВ России циркулируют *M. suifunensis* и *M. pusillus*, которые ранее были отнесены к видам *M. yokogawai* и *M. katuradai* соответственно. Молекулярно-генетические данные, полученные для особей *M. suifunensis* юга ДВ России, включая территории Приморья, Хабаровского края и Еврейской автономной области, позволили определить векторы распространения *M. suifunensis* в исследуемом регионе, а также выявить вероятные пути становления популяции паразита, проанализировать ее современную структуру и возможные процессы ее трансформации. Полученная информация о возбудителях метагонимоза юга ДВ России, с одной стороны, обеспечивает возможность объективной диагностики заболевания и соответственно дифференциацию паразитарной инфекции от заболевания иной этиологии. С другой – эти данные важны для прогнозирования возможного формирования новых очагов метагонимоза на ДВ России и прилегающих территориях, в том числе других странах Восточной и Юго-Восточной Азии. Результаты исследований также могут служить основой для изучения других представителей надсемейства Opisthorchioidea, в том числе и эпидемиологически значимых видов.

Методология и методы диссертационного исследования. Материал для исследования представителей рода *Metagonimus* был собран на юге ДВ России, включая территории Приморского и Хабаровского краев, а также

Еврейской автономной области. Для установления видового статуса метагонимусов, а также оценки генетического разнообразия и популяционной структуры *M. suisfunensis* в работе использовали методы классической паразитологии (изучение морфологии стадий развития) и молекулярно-генетические маркеры. Полученные нуклеотидные последовательности обработаны с помощью стандартных программ для анализа генетических данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. На территории Дальнего Востока России циркулируют два эндемичных вида рода *Metagonimus*.

2. Исходя из молекулярно-генетических данных, центр формирования популяции *Metagonimus suisfunensis* – юго-западная часть Хабаровского края, откуда произошла экспансия паразита в южном направлении с дальнейшим формированием северных и южных изолированных субпопуляций, которые обмениваются мигрантами в настоящее время.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международных конференциях «Modern achievements in population, evolutionary, and ecological genetics: International symposium», г. Владивосток (2015, 2017, 2019, 2022); международной научной конференции «Генетика популяций: прогресс и перспективы», г. Москва (2017); международной научной конференции «Биоразнообразие паразитов», г. Москва (2018); всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы обеспечения биологической безопасности на Дальнем Востоке России», г. Владивосток (2021) и 4й всероссийской конференции с международным участием «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии», г. Улан-Удэ (2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах,

иллюстрирована 17 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы насчитывает 146 наименований, из них 118 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Татоновой Ю.В., а также заведующему лаборатории паразитологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН д.б.н. Беспрозванных В.В. за часть предоставленного паразитологического материала и помощь в подготовке диссертации, всем коллегам из лаборатории паразитологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку и ценные замечания, сотрудникам лаборатории клеточной биологии и биологии развития к.б.н. Горпенченко Т.Ю. и Казарину В.М. за консультации при освоении методов электронной микроскопии, а также д.б.н. Картавцевой И.В. и д.б.н., профессору Челоминой Г.Н. за конструктивные замечания.

Данная работа частично выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №17-65-00004 и РФФИ №19-34-90126.

ГЛАВА 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *METAGONIMUS* И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭТОГО МЕТОДЫ

Виды рода *Metagonimus* (Trematoda: Heterophyidae Leiper, 1909) – мелкие трематоды, паразитирующие в тонком кишечнике птиц и млекопитающих, в том числе человека. В процессе изучения особенностей биологии *Metagonimus* было установлено, что их жизненный цикл протекает с участием первых промежуточных хозяев – пресноводных моллюсков отряда Cerithioidea Fleming, 1822, вторых промежуточных хозяев – различных видов рыб (преимущественно Cyprinidae Rafinesque, 1815), а в качестве окончательных хозяев выступают теплокровные животные (Беспрозванных и др., 1987; Ahn, 1993; Saito et al., 1997; Shimazu, Urabe, 2002; Chai et al., 2005; Ермоленко и др., 2015 и др.) (рисунок 1).

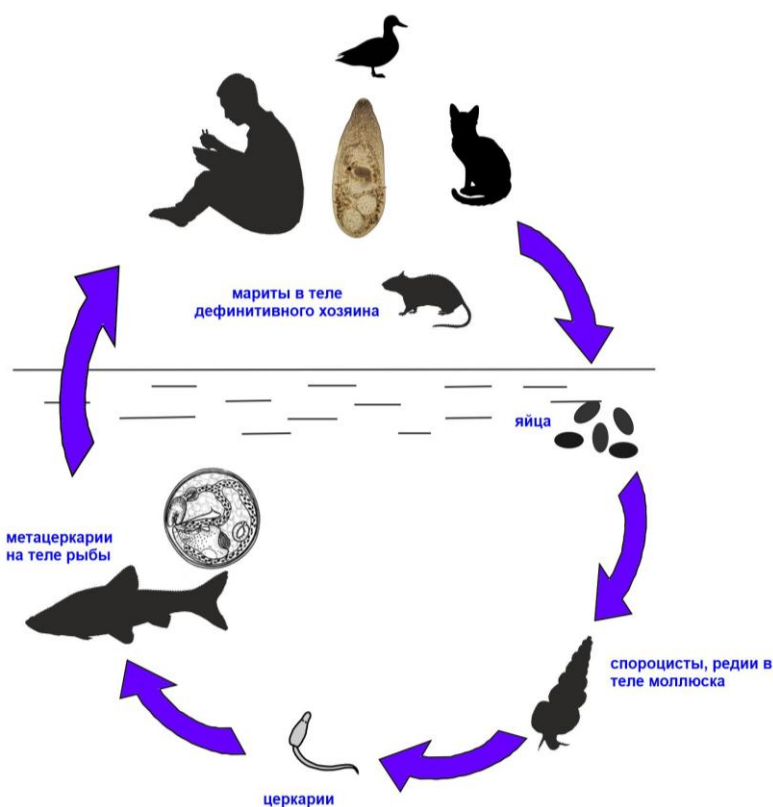


Рисунок 1 – Жизненный цикл представителей рода *Metagonimus*

Типовой вид рода *Metagonimus yokogawai* был обнаружен в Японии (Katsurada, 1912). Позднее на территории восточноазиатского региона было

зарегистрировано ещё 7 видов этого рода: *Metagonimus takahashii*, *Metagonimus miyatai*, *Metagonimus minutes*, *Metagonimus katsuradai*, *Metagonimus otsurui*, *Metagonimus hakubaensis* и *Metagonimus ovatus* (Katzuta, 1932; Ahn, 1993; Saito et al., 1997; Shimazu, 1999; Shimazu, Urabe, 2002; Yokogawa, 2013; Kudo et al., 2014; Chai, 2015). Пять видов данного рода зарегистрированы как паразиты человека (*M. yokogawai*, *M. takahashii*, *M. minutus*, *M. miyatai* и *M. katsuradai*) (Ito, 1964a; Yu, Mott, 1994; Saito, 1997; Chai, 2015; Chai, 2017) и включены в список наиболее важных пищевых паразитов в мире (Chai et al., 2005).

Трематоды *M. yokogawai* изначально были отнесены к роду *Heterophyes* Cobbold, 1866 и позднее выделены в отдельный род, *Metagonimus*, на основании особенностей морфологии вендрогенитального комплекса (Katsurada, 1912).

Особи *M. takahashii* и *M. miyatai* имеют значительное морфологическое сходство с *M. yokogawai*, поэтому их рассматривали как его подвиды. Однако в более поздних исследованиях описан ряд морфологических различий между этими видами. Видовая самостоятельность *M. miyatai* была обоснована в 1997 году Сайто с соавторами (Saito et al., 1997), *M. takahashii* также признан валидным видом (Kino et al., 2006). Как показали авторы последней работы, помимо морфологических различий, эти паразиты отличаются специфичностью ко второму промежуточному хозяину. Кроме того, у этих трех видов имеются различия в ультраструктуре тегумента (Lee et al., 1984; Chai et al., 1998; Chai et al., 2000).

На территории России представители рода *Metagonimus* впервые были обнаружены в 1928 году в ходе 60-й Союзной гельминтологической экспедицией на Дальнем Востоке под руководством К.И. Скрябина. Очаги метагонимоза регистрировали в Верхнем Приамурье, Хабаровском крае. Позже были проведены исследования, уточняющие видовое разнообразие представителей рода *Metagonimus*, получены данные по их жизненному циклу, кругу промежуточных и окончательных хозяев и распространенности

на юге Дальнего Востока России (Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных и др., 1987; Подолько и др., 2012; Чертов, 2013 и др.). В результате установлено, что в исследуемом регионе циркулирует две морфологически разные трематоды, которые были отнесены к видам *M. yokogawai* и *M. katsuradai*. Для обоих паразитов выявлено, что роль первых промежуточных хозяев выполняют моллюски рода *Parajuga* Prozorova, Starobogatov, 2004, вторых – пресноводные виды рыб, преимущественно семейства Cyprinidae Rafinesque, 1815 (Беспрозванных и др., 1987, Ермоленко, Беспрозванных, 2005). Видовая принадлежность этих червей до настоящего исследования не была подтверждена с использованием молекулярных данных.

Родовой и видовой статус других представителей надсемейства Opisthorchioidea Looss, 1899, к которым относятся черви рода *Metagonimus*, также до недавнего времени устанавливал только на основе морфологических характеристик. В дальнейшем для изучения этой группы паразитов стали применять различные молекулярные методы, и в результате были выявлены наиболее эффективные подходы для решения задач таксономии и филогении, а также для описания популяционной структуры паразитов.

Первым поколением молекулярных маркеров, используемых для генетических исследований, является анализ полиморфизма белков. Из белковых маркеров наиболее широко используются аллозимы. К сожалению, основной недостаток данного метода заключается в том, что он не дает представлений об изменчивости всего генома, что ограничивает их применение (Марсан, Олденброк, 2010). Тем не менее, некоторые исследователи успешно использовали анализ аллозимного полиморфизма в исследованиях разных паразитов. Например, на основе этого метода Сайджунта с соавторами (Saijuntha et al., 2010) разделили два вида трематод рода *Echinostoma* Rudolphi, 1809, но авторы отмечают, что также он может быть пригодным и для оценки внутривидовой изменчивости для указанных

видов. Этот маркер успешно использован и в работе Жигилевой с соавторами (2012) для описания генетической изменчивости и дифференциации популяций представителя надсемейства Opisthorchioidea – *Opisthorchis felineus* Rivolta, 1884 (Opisthorchiidae Looss, 1899) Западной Сибири.

В последние годы для подтверждения видовой идентификации, основанной на морфологических данных, изучения филогенетических отношений и оценки генетического разнообразия популяций разных трематод используют ДНК-маркеры (Waikagul et al., 2014). Среди них одними из наиболее популярных маркеров являются микросателлиты (SSR (Simple Sequence Repeats) или STR (Simple Tandem Repeats)). Особенность микросателлитов заключается в том, что можно относительно просто получить информацию об их молекулярной структуре, а также о скорости накопления мутаций (Jarne, Lagoda, 1996). Этот метод был успешно применен для диагностики *Opisthorchis viverrini* Poirier, 1886 (Arimatsu et al., 2015). Полученные в исследовании результаты показали, что микросателлиты могут дифференцировать близкородственные виды.

Также в настоящее время для уточнения таксономического статуса трематод и установления межвидовых различий используется метод, основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ/RFLP). При использовании определенного фермента можно выявить полиморфизм по конкретному сайту, анализируя длину рестрикционных фрагментов ДНК. Например, при помощи RFLP-анализа участка ITS1 рДНК было выявлено, что *M. takahashii* и *M. miyatai* генетически отличаются от *M. yokogawai*, то есть все три вида имеют разные RFLP-паттерны (Yu et al., 1997). Стоит отметить, что в данной работе были также проанализированы данные по рестрикционному анализу последовательностей гена *cox1* мтДНК, которые подтвердили выводы, полученные с использованием ядерной ДНК. При этом различия по митохондриальному маркеру были более ярко выражены. Другой мультилокусный метод, RAPD-анализ (Random amplification of polymorphic DNA, или произвольно (случайно)

амплифицированная полиморфная ДНК), был применен для изучения генетической изменчивости *O. viverrini* (Opisthorchiidae) из разных локалитетов на северо-востоке Тайланда и Лаоса (Sithithaworn et al., 2007). В данной работе было обнаружено, что образцы *O. viverrini* из Лаоса отличаются по профилям RAPD от всех образцов из Северо-Восточного Тайланда. Для обнаружения отличий между *M. yokogawai* и *M. miyatai* Юю с соавторами (Yu et al., 1997) также использовали метод RAPD: при помощи этого метода были получены отличающиеся паттерны для указанных видов, что позволило достоверно их дифференцировать.

Широко используются для изучения генетической изменчивости и филогенетических отношений трематод и нуклеотидные последовательности, в частности участки рибосомального кластера, которые примечательны тем, что его разные части эволюционируют с разной скоростью (Lapierre, 2011). Рибосомальный кластер для разных эукариотических организмов имеет общую структуру: два внутренних транскрибируемых спейсера, ITS1 и ITS2, отделяют друг от друга области, включающие гены 18S, 5.8S и 28S рРНК. Для трематод последовательности ITS1 и ITS2 были впервые секвенированы Лютоном с соавторами (Luton et al., 1992). В настоящее время эти маркеры успешно применяют для дифференциации близких видов и описания генетической изменчивости разных трематод (Morgan, Blair, 1995; Vilas et al., 2005). Так, например, для изучения филогенетических отношений внутри надсемейства Opisthorchioidea в работе Тэнкхам с соавторами (Thaenkham et al., 2012) были использованы последовательности генов 18S и 28S рРНК, а также участок ITS2 рДНК. Авторы отметили, что при помощи молекулярно-филогенетического анализа с использованием маркеров 18S и ITS2 невозможно разделить Opisthorchiidae и Heterophyidae на отдельные семейства, несмотря на явно разную морфологию взрослых червей. Результаты данного исследования также показали, что нуклеотидные последовательности участка ITS2 рДНК не подходят для анализа представителей Opisthorchioidea на уровне семейств. Тем не менее, данный

маркер успешно применялся ранее, в том числе для анализа отношений между видами внутри семейства Heterophyidae (Thaenkham et al., 2010). Для филогенетического анализа представителей рода *Metagonimus* также был использован участок ITS2 рДНК и ген 28S рРНК ядерной ДНК (Pornruseetairatn et al., 2016). В указанной работе авторы проанализировали шесть видов рода *Metagonimus* и выявили уровень нуклеотидных отличий, определяющих видовой статус.

В сочетании с нуклеотидными последовательностями ядерной ДНК для изучения филогенетических отношений и популяционной изменчивости трематод часто используют и митохондриальные маркеры. Митохондриальная ДНК, наследуемая по материнской линии, обладает большей скоростью эволюции, чем ядерная ДНК (Bowles, 1995), поэтому такие маркеры могут выявить различия, которые отсутствуют или менее выражены при анализе ядерной ДНК. Выше об этом упоминалось в случае использования RFLP-анализа для видов *Metagonimus* (Yu et al., 1997). В популяционно-генетических исследованиях из митохондриальных генов нуклеотидные последовательности первой субъединицы цитохром-с оксидазы (*cox1*) применяются наиболее часто (Brusentsov et al., 2013). Этот маркер также используют и для филогенетического анализа, например, с использованием последовательностей гена *cox1* мтДНК проанализированы шесть видов рода *Metagonimus*, которые разделились на две хорошо поддерживаемые клады (Pornruseetairatn et al., 2016). Это коррелировало с данными по последовательностям ядерной ДНК, но отличия между видами по митохондриальному маркеру имели более высокие значения. Поэтому авторы этой работы указывают, что необходимо комбинировать ядерные и митохондриальные маркеры для получения достоверных данных.

Помимо гена *cox1* мтДНК, для реконструкции филогенетических отношений трематод используют и другие гены мтДНК: *cox3*, *cytb*, *nad1*, *nad4*, *rrnS* и *nad5*. Например, с применением объединенной последовательности генов *cytb*, *nad1* и *cox1* Дао с соавторами (Dao et al.,

2017) определили видовую принадлежность представителя рода *Opisthorchis* sp., обозначаемого ранее как «*viverrini*-подобные», которого они извлекли из естественно зараженных домашних уток. Полученные в этом исследовании результаты показали, что *Opisthorchis* sp. отличался от *O. viverrini*, хотя и находится с ним в близком родстве (Dao et al., 2017). В другой работе частичные последовательности гены *cox1*, *cox2*, *nad1* и *nad2* мтДНК использованы для изучения уровня генетической изменчивости *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) Looss, 1907 из разных эндемичных регионов Китая. Результаты показали наличие внутривидовой изменчивости последовательностей мтДНК среди изолятов *C. sinensis* из разных регионов, при этом изменчивость гена *cox1* мтДНК была выше, чем для генов *cox2*, *nad1* и *nad2* мтДНК (Liu et al., 2012).

Также для анализа филогенетических отношений трематод используют и полноразмерные последовательности митохондриального генома. По состоянию на август 2022 г., в базе данных NCBI были доступны полные митохондриальные геномы для 16 представителей надсемейства Opisthorchioidea. Исследователи из Китая секвенировали полные митохондриальные геномы *O. viverrini* и *C. sinensis* и реконструировали филогенетические отношения трематод с использованием объединенных аминокислотных последовательностей 12 белок-кодирующих генов (Cai et al., 2012). Позднее секвенированы полные митохондриальные геномы *O. felineus* и *C. sinensis* (Shekhovtsov et al., 2010). В последней работе авторы высказали предположение, что гены *nad2* и *nad5* наиболее изменчивы, и поэтому являются более подходящими для внутривидовых исследований (Shekhovtsov et al., 2010). Из представителей рода *Metagonimus* в базе данных NCBI (GenBank) доступна одна последовательность полного митохондриального генома для *Metagonimus yokogawai* (KC33075), однако эти данные не имеют подтверждающей публикации.

Таким образом, последовательности ядерной и митохондриальной ДНК могут успешно применяться в исследованиях филогенетических отношений

и для оценки генетического разнообразия трематод, в том числе, для представителей надсемейства Opisthorchioidea и рода *Metagonimus*, в частности. Однако при выборе маркера необходимо учитывать особенности его наследования и уровень изменчивости. Более того, видовой статус и отношения таксонов более высокого ранга должны быть проанализированы в комплексе с морфологическими критериями и данными о жизненных циклах трематод. Что касается получения объективных представлений о популяционной структуре, то для ранее не изученных паразитов необходимо применять сразу нескольких молекулярных маркеров, поскольку даже наличие высокого уровня изменчивости в отдельных генах не всегда является определяющим фактором при выборе подходящих для анализа нуклеотидных последовательностей. Все эти моменты были учтены при проведении настоящего исследования.

В настоящей работе помимо морфологических данных для видовой идентификации и анализа филогенетических связей были использованы три генетических маркера (ген 28S, участок ITS2 рДНК и ген *cox1* мтДНК), которые ранее были успешно применены для разделения шести представителей рода *Metagonimus* (Pornruseetairatn et al., 2016). Выбор маркеров для популяционного анализа был первоначально основан на использовании полноразмерных нуклеотидных последовательностей участка ITS рДНК и гена *cox1* мтДНК для *C. sinensis*, представителя надсемейства Opisthorchioidea, циркулирующего на юге Дальнего Востока России и имеющего сходный жизненный цикл (Chelomina et al., 2014, Tatonova et al., 2017). Последовательности гена *cytb* мтДНК были получены как дополнительный маркер, поскольку ген *cox1* мтДНК не выявил подразделенности внутри популяции *M. suifunensis* (Tatonova, Shumenko, 2021), а третий ген (*nad1*) был включен в работу, поскольку обычно он является более изменчивым, чем два предыдущих митохондриальных маркера, как было показано ранее для других трематод (Semyenova et al., 2006; Zhao et al., 2013; Elliott et al., 2014).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Получение паразитологического материала

В настоящей работе был получен паразитологический материал для двух видов *Metagonimus*, обозначенных как *M. suifunensis* и *M. pusillus*. Обоснование выделения новых видов представлено в разделе 3.2.

Для получения половозрелых особей *M. suifunensis* материалом послужил моллюск рода *Parajuga* из реки Комаровка (бассейн р. Раздольная), инвазированный партенитами *Metagonimus*, и пресноводные рыбы *Rhodeus sericeus sericeus* (обыкновенный горчак) и *Phoxinus lagowskii* (гольян Лаговского) из рек Комаровка, Комиссаровка, Илистая, Одарка, Сорочевка, Арсеньевка Приморского края; рек Анюй, Одыр, Белая Хабаровского края и реки Бира Еврейской автономной области (рисунок 2). Церкариями, выделяющимися из моллюска *Parajuga*, были инфицированы 5 рыб *R. sericeus sericeus*. Рыбы отловлены в искусственном водоеме г. Владивостока. Для контроля было предварительно обследовано 30 рыб этого вида из указанного водоема, и метацеркарий каких-либо трематод не было обнаружено. На 35 сутки с момента инфицирования при температуре воды 20-22 °С у рыб под чешуей были обнаружены зрелые метацеркарии *Metagonimus*, и рыбы были скормлены двум лабораторным крысам. На 13 сутки после инфицирования в заднем отделе тонкого кишечника обеих крыс были обнаружены соответственно 10 и 17 половозрелых червей *M. suifunensis*. Наряду с этим по 10 рыб (5 *R. sericeus sericeus* и 5 *P. lagowskii*) из всех указанных выше водоемов, отдельно, в течение 3 дней, скормили лабораторным крысам. В каждом эксперименте использовали по 2 крысы. На 10-13 сутки от момента последнего кормления крысы были вскрыты. Перед вскрытием крыс усыпляли хлороформом. Все крысы заразились с разной интенсивностью: от 7 до 355 половозрелых червей *M. suifunensis*.



Рисунок 2 – Места сбора промежуточных хозяев трематод рода *Metagonimus*.
 Приморский край: 1 – р. Комиссаровка, 2 – р. Комаровка, 3 – р. Сорочевка, 4 – р. Одарка, 5 – р. Илистая, 6 – р. Арсеньевка;
 Хабаровский край: 7 – р. Ануй, 8 – р. Одыр, 9 – р. Белая;
 Еврейская автономная область: 10 – р. Бира

Помимо этого, ещё в одном эксперименте пять рыб *Rhodeus sericeus sericeus*, выловленных в реке Большая Уссурка, скормили утенку (*Anas platyrhynchos domestica*). Через 10 дней после заражения из тонкого кишечника были извлечены восемь половозрелых червей *M. pusillus*.

Изучение морфологии трематод на всех выявленных стадиях развития проводилось под бинокулярными микроскопами Микромед МС1 вариант 2С и ЛабоМед-4 вариант 4. Экспериментальные работы проводились в соответствии с Положением о комиссии по регулированию экспериментальных исследований ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

2.2 Исследование морфологии

Половозрелых червей, извлеченных из кишечника окончательных хозяев, помещали в воду, где они находились до момента гибели, затем фиксировали в 70% этаноле, после этого переводили в 96% этанол для хранения. Часть червей использовали для приготовления постоянных препаратов. Для их изготовления червей отмачивали в дистиллированной воде, затем окрашивали квасцовым кармином, обезвоживали в этаноле повышающейся концентрации от 50% до 100%, осветляли в гвоздичном масле и заключали в канадский бальзам. Изучение морфологии трематод на всех выявленных стадиях развития проводили под бинокулярными микроскопами Микромед МС1 вариант 2С и ЛабоМед-4 вариант 4. Промеры партенит и метацеркарий сделаны на живых особях, церкарий перед измерением фиксировали в горячем 4% формалине. Все размеры приведены в мм.

Сравнение морфологических параметров проводили с видами, которые числились в составе рода до начала настоящего исследования: *M. yokogawai*, *M. takahashii*, *M. miyatai*, *M. hakubaensis*, *M. katuradai*, *M. otsurui*, *M. minutus* и *M. ovatus*, поскольку 4 других вида (*M. saitoi*, *M. kogai*, *M. shimazui* и

M. kanoi) были описаны позже (Nakao et al., 2022), с учетом данных по двум видам, полученным в этой работе.

2.3 Сканирующая электронная микроскопия

Часть фиксированных половозрелых червей *Metagonimus* использовали для исследования структуры поверхности тела с помощью сканирующего электронного микроскопа. Образцы отмачивали в дистиллированной воде в течение 15 часов при температуре 4 °С, затем промывали фосфатным буфером и переносили в 3% глутаральдегид на 1 час при температуре 4 °С. После этого образцы промыли в дистиллированной воде в течение 5 минут и проводили через батарею спиртов с возрастающей концентрации от 20% до 100%. Далее после перенесения образцов на столик, производили напыление углеродом в приборе Quorum Q150TES (TESCAN, Россия). Электронные фотографии мариит получены при помощи микроскопа ZEISS EVO 40 (Carl Zeiss, Германия) на базе центра коллективного пользования Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток).

2.4 Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли методом HotSHOT (Truett et al., 2000) из червей, фиксированных 96% этанолом. Перед выделением ДНК каждый образец помещали в отдельную пробирку, высушивали спирт при температуре 60 °С в течение 20 минут. Затем добавляли в пробирку 75 мкл раствора для щелочного лизиса (25 мМ NaOH, 0,2 мМ ЭДТА, рН=12), центрифугировали для опускания образцов на дно пробирки, нагревали до 95°С в течение 30 минут. Далее раствор охлаждали в течение 10 минут и добавляли 75 мкл нейтрализующего буфера (40 мМ Трис-НСl, рН=5). Готовый раствор ДНК хранили при -20 °С.

2.5 Получение последовательностей ДНК

Частичные последовательности гена 28S рРНК и полноразмерные последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, а также последовательности митохондриальных генов *cox1*, *cytb* и *nad1* амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием прямого и обратного праймеров для каждого фрагмента ДНК. Праймеры, использованные в данном исследовании, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для амплификации участков ДНК

Участок ДНК	Праймер	Последовательность 5'→3'	Ориентация	Ссылка
ITS1-5.8S-ITS2	BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA	Прямой	Morgan, Blair, 1995
	28S1R	AAGTATTTAGCCTTGGATGGAGTTT	Обратный	Shumenko et al., 2017
28S	DIG12	AAGCATATCACTAAGCGG	Прямой	Tkach et al., 2003
	1500R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Обратный	Tkach et al., 2003
<i>cox1</i>	MPF26	CTGTCCGTCTTCAAAATGG	Прямой	Tatonova et al., 2019
	McR4	CTCACCTCTTCTACAACCTCTC	Обратный	
	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	Прямой	Bowles, McManus, 1994
	JB4.5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	Обратный	
<i>cytb</i>	cyt1F1	GCCTCTCTCCTGTAAGTTAT	Прямой	Tatonova, Shumenko, 2021
	cyt2R4	AGAACCTAAACAGAATCACA	Обратный	
<i>nad1</i>	nadF2-1	GTTTATTTTTGAATAGTAGC	Прямой	Shumenko, Tatonova, 2022
	nadR14	AAAGCACCTCCTCCAAGTTA	Обратный	

Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержала следующие компоненты: 5 мкл раствора GoTaq Master Mix (Promega, USA), содержащего Taq-полимеразу, dNTP, MgCl₂ и реакционные буферы в оптимальных

концентрациях, 0,25-0,5 мкл каждого из праймеров концентрацией 10 мкМ, а также 3-4 мкл ДНК исследуемого образца. ПЦР проводили в амплификаторе GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, США). Амплификацию последовательностей гена 28S рРНК и участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК проводили в следующих условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 94 °С, далее 35 циклов: денатурация (15 сек при 94 °С), отжиг праймеров (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 10 °С. Амплификацию гена *cox1* мтДНК производили при следующих условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 95 °С, далее 35 циклов: денатурация (30 сек при 94 °С), отжиг праймеров (1 мин при 57 °С), синтез (2 мин при 72 °С). Реакция завершалась дополнительным синтезом в течение 7 мин при 72 °С и охлаждением до 10 °С. Последовательности генов *cytb* и *nad1* мтДНК амплифицировали при сходных условиях при температуре отжига 51 и 47 °С соответственно. Для каждой пары праймеров использовали отрицательный контроль – реакцию без ДНК.

Полученный ПЦР-продукт переосаждали по следующей методике:

1. Добавляли в каждую пробирку по 1,0 мкл 3М ацетата натрия и перемешивали.
2. Добавляли в каждую пробирку по 10 мкл изопропилового спирта, выдерживали образцы при температуре -20 °С в течение 30 мин.
3. Центрифугировали на максимальных оборотах (13 200 об./мин) в течение 10 мин.
4. Убирали спирт и добавляли 40 мкл 70% этилового спирта.
5. Центрифугировали на максимальных оборотах (13 200 об./мин) в течение 10 мин.
6. Убирали спирт, образцы сушили при 70 °С в течение 5 мин и далее при 60°С в течение 15 мин.

7. Добавляли 4 объема предварительно обработанной ультрафиолетом дистиллированной воды. Полученный продукт хранили при -20 °С.

Далее производили реакцию секвенирования в 10 мкл в следующих условиях: предварительная денатурация 1 мин при 96 °С, 30 циклов: денатурация (30 сек при 96 °С), отжиг праймера (30 сек при 55 °С), синтез (4 мин при 60 °С), затем охлаждали до 10 °С. Данные условия были идентичными для всех маркеров. Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: 4 мкл ПЦР-продукта, 0,5 мкл праймера и 1 мкл BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США). Праймеры, использованные для секвенирования, перечислены в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для секвенирования участков ДНК

Участок ДНК	Праймер	Последовательность 5'→3'	Ориентация	Ссылка
ITS1-5.8S-ITS2	R1i15	CCATTCTGACAGCACATCCCGT	Обратный	Tatonova et al., 2012
28S	900F	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	Прямой	Tkach et al., 2003
	ECD2	CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG	Обратный	Tkach et al., 2003
	1200R	GCATAGTTCACCATCTTTCGG	Обратный	Waeschenbach et al., 2009
<i>cox1</i>	CF2	TTTTCTTCTTCTTGATGCCG	Прямой	Tatonova et al., 2019
	CR1	CAAAACCACCAATCAAGACC	Обратный	
	CR7	ATGTCCAAGAACCAAAACA	Обратный	
	CF7	GGTCGTATAGGACTGTGGTA	Прямой	
	MrR30	TCCCCAATCCTAGCCATAG	Обратный	
<i>cytb</i>	ciF1	TCAGGGTGATTCATCTTTTT	Прямой	Tatonova, Shumenko, 2021
	ciR3	GGGGCAAACAAGGATTATTA	Обратный	
<i>nad1</i>	nadF2-1	GTTTATTTTTGAATAGTAGC	Прямой	Shumenko, Tatonova, 2022
	nadR14	CGATTACACTCACACAACAT	Обратный	

Продукты циклического секвенирования очищали по описанной выше методике за исключением того, что после этапа сушки ПЦР-продукт хранили в сухом виде при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постановки в генетический анализатор. Перед постановкой в секвенатор в пробирки добавляли по 12 мкл Hi-Di™ формамида, затем денатурировали в течение 3 мин при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нуклеотидную последовательность ДНК-продуктов определяли на капиллярном секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США; капилляры длиной 50 см; полимер POP-7) на базе центра коллективного пользования Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток). Полученные последовательности визуализировали в программе Finch TV 1.4.0, собирали и выравнивали вручную в программе MEGA 5.03 с использованием опции Clustal W (Tamura, 2011).

2.6. Филогенетический анализ

Для анализа филогенетических отношений помимо нуклеотидных последовательностей гена 28S рРНК, участка ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК, полученных в настоящем исследовании, использовали последовательности представителей рода *Metagonimus*, доступных в базе данных NCBI на момент проведения настоящих исследований (таблица 3). В качестве внешней группы при построении филогенетических реконструкций выбрали вид *Notocotylus magniovatus*, поскольку согласно работе Накао и Сасаки (Naкао, Sasaki, 2021), максимально близкой группой, занимающей базальное положение по отношению к представителям рода *Metagonimus*, были черви из семейства Notocotylidae. Для указанного вида использовали следующие нуклеотидные последовательности из базы данных NCBI: MH750016 для гена 28S рРНК, MH750018 для участка ITS2 рДНК и LC597083 для гена *cox1* мтДНК. После выравнивания все последовательности имели следующую длину: 1058, 281 и 336 п.н. для гена 28S рРНК, участка ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК соответственно.

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности и информация об образцах, использованных для филогенетического анализа

Вид	Локалитет	Длина, п.н.	<i>n</i>	Номера в базе данных NCBI	Ссылка
Участок ITS1-5.8S- ITS2 рДНК					
<i>M. suifunensis</i> * [▲]	р. Комиссаровка (Приморский край)	1134	12	KX387483- KX387494	Shumenko et al., 2017 (настоящее исследование)
	р. Комаровка (Приморский край)	1134	29	KX387461- KX387482, KX387495- KX387501	
	р. Сорочевка (Приморский край)	1134	1	KX387502	
	р. Арсеньевка (Приморский край)	1134	6	KX387503- KX387508	
	р. Илистая (Приморский край)	1134	6	KX387519- KX387524	
	р. Одарка (Приморский край)	1134	10	KX387509- KX387518	
<i>M. yokogawai</i> *	Китай	1178	1	KJ631740	не опубликовано
<i>M. pusillus</i> * [▲]	р. Большая Уссурка (Приморский край)	1144	2	MF407173 MF407172	Tatonova et al., 2018 (настоящее исследование)
Участок ITS2 рДНК					
<i>M. yokogawai</i> **	Корея***	284	3	AB470520, AB470522, AB470523	не опубликовано
		287	3	AB470521, AB470524, AB470525	не опубликовано
	Китай, реки провинции Хэйлунцзян	284	2	KX857497, KX832895	Qiu et al., 2017
	Китай	284	2	KJ631734, KJ631737	не опубликовано
	р. Тэнрю, Япония	284	3	HQ832621, HQ832622, HQ832623	Thaenkham et al., 2012; Pornruseetairatn et al., 2016
<i>M. miyatai</i> **	р. Нагара, Япония	284	3	HQ832615, HQ832616, HQ832617	Pornruseetairatn et al., 2016

Продолжение таблицы 3

Вид	Локалитет	Длина, п.н.	<i>n</i>	Номера в базе данных NCBI	Ссылка
Участок ITS2 рДНК					
<i>M. takahashii</i> **	р. Кисо, Япония	287	3	HQ832618, HQ832619, HQ832620	Thaenkham et al., 2012; Pornruseetairatn et al., 2016
<i>M. hakubaensis</i> **	р. Химэ, Япония	279	3	KM061397, KM061398, KM061399	Pornruseetairatn et al., 2016
<i>M. katuradai</i> **	оросительный канал, Мияке, Япония	277	3	KM061400, KM061401, KM061402	
<i>M. otsurui</i> **	р. Ньюкава, Япония	277	3	KM061403, KM061404, KM061405	
<i>Metagonimus</i> sp. 4**	о. Хоккайдо, Япония	281	1	LC422948	не опубликовано
<i>Metagonimus</i> sp. 5**	о. Хоккайдо, Япония	281	1	LC422947	не опубликовано
<i>Metagonimus</i> sp. 6**	о. Хоккайдо, Япония	281	1	LC422951	не опубликовано
<i>Notocotylus magniovatus</i> (внешняя группа)*	р. Раздольная, Россия	285	1	MH750018	Izrailaskaia et al., 2019
Ген 28S рРНК					
<i>M. suifunensis</i> ***,▲	р. Комиссаровка (Приморский край)	1058	2	KX387456, KX387459	Shumenko et al., 2017 (настоящее исследование)
	р. Комаровка (Приморский край)	1058	3	KX387457, KX387458, KX387460	
<i>M. yokogawai</i> **	р. Тэнрю, Япония	1296	3	HQ832639, HQ832640, HQ832641	Pornruseetairatn et al., 2016
<i>M. miyatai</i> **	р. Нагара, Япония	1296	3	HQ832633, HQ832634, HQ832635	
<i>M. takahashii</i> **	р. Кисо, Япония	1296	3	HQ832636, HQ832637, HQ832638	
<i>M. hakubaensis</i> **	р. Химэ, Япония	1139	3	KM061388, KM061389, KM061390	
<i>M. katuradai</i> **	оросительный канал, Мияке, Япония	1143	3	KM061391, KM061392, KM061393	
<i>M. otsurui</i> **	р. Ньюкава, Япония	1143	3	KM061394, KM061395, KM061396	

Окончание таблицы 3

Вид	Локалитет	Длина, п.н.	<i>n</i>	Номера в базе данных NCBI	Ссылка
Ген 28S рРНК					
<i>M. pusillus</i> ** [▲]	р. Большая Уссурка (Примор. край)	1403	2	MF407173 MF407172	Tatonova et al., 2018 (настоящее исследование)
<i>Metagonimus</i> sp. 1**	о. Хоккайдо, Япония	1269	3	LC375946; LC599529 LC599530	не опубликовано Nakao, Sasaki, 2021
<i>Metagonimus</i> sp. 2**	о. Хоккайдо, Япония	1269	1	LC599531	Nakao, Sasaki, 2021
<i>Metagonimus</i> sp. 3**		1270 1269	1 2	LC422950 LC599533, LC599534	
Ген <i>cox1</i> мтДНК					
<i>M. suifunensis</i> ** [▲]	р. Комиссаровка (Примор. край)	335	1	MF406211	Tatonova et al., 2018 (настоящее исследование)
	р. Комаровка (Примор. край)		1	MF406212	
	р. Сорочевка (Примор. край)		1	MF406213	
	р. Арсеньевка (Примор. край)		2	MF406214, MF406215	
	р. Одарка (Примор. край)		1	MF406216	
	р. Илистая (Примор. край)		1	MF406217	
<i>M. pusillus</i> ** [▲]	р. Большая Уссурка (Примор. край)		2	MF406209, MF406210	
<i>M. yokogawai</i> *	Корея***	1538	1	KC330755	не опубликовано
<i>M. yokogawai</i> **	р. Тэнрю, Япония	346	3	KM061412- KM061414	Pornruseetairatn et al., 2016
<i>M. takahashii</i> **	р. Кисо, Япония	346	3	KM061406- KM061408	
<i>M. miyatai</i> **	р. Нагара, Япония	346	3	KM061409- KM061411	
<i>M. hakubaensis</i> **	р. Химэ, Япония	346	3	KM061415- KM061417	
<i>M. katsuradai</i> **	оросительный канал, Мияке, Япония	346	3	KM061418- KM061420	
<i>M. otsurui</i> **	р. Ньюкава, Япония	346	3	KM061421- KM061423	
<i>Notocotylus magniovatus</i> (внешняя группа) **	Япония	801	1	LC597083	Sasaki et al., 2021

*, ** – полные и частичные нуклеотидные последовательности соответственно,
 ▲ – валидность видов обоснована в настоящем исследовании, *** – Республика Корея
 (далее по тексту – Корея), *n* – число последовательностей, использованных в анализе.

Генетические *p*-дистанции, нуклеотидный состав и типы нуклеотидных замен оценили с помощью MEGA. Оптимальные модели для построения филогенетических деревьев (GTR+I для гена 28S рРНК, TPM1uf+G для участка ITS2 рДНК и TIM1+G для гена *cox1* мтДНК) были определены в программе jModeltest 2.1.5 (Darriba et al., 2012). Филогенетический анализ выполнили методами ML (максимального правдоподобия) в программе PhyML (Guindon, Gascuel, 2003) и методом Байеса (BI) в программе MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Для BI-анализа гена 28S рРНК задали 200 000 генераций МСМС (цепи Маркова-Монте-Карло). Такого количества генераций было достаточно, чтобы величина стандартного отклонения составила менее 0,01. Первые 500 проб (25%) исключили из анализа. Для участка ITS2 использовали 2 400 000 генераций МСМС, из анализа исключили первые 6 000 образцов (25%). Для частичной последовательности гена *cox1* мтДНК было задано 2 000 000 генераций, а из анализа исключили первые 5 000 проб. Поскольку деревья, построенные методами ML и BI, имели сходную топологию, в работе привели консенсусные деревья по данным, полученным этими двумя методами.

2.7. Популяционный анализ

В исследовании был проведен анализ популяционной структуры *Metagonimus suisfunensis* на основе полноразмерных последовательностей генов *cox1*, *cytb* и *nad1* мтДНК, а также объединенного массива данных по этим маркерам. Последовательности, использованные для популяционного анализа, приведены в таблице 4. Названия рек соответствует названию локалитетов и субпопуляций, указанных в главе «Результаты и обсуждение».

С помощью программы MEGA оценили полиморфизм последовательностей, изменчивость аминокислот и генетические дистанции между образцами. С использованием программы DnaSP 5.10 (Librado, Rozas, 2009) оценили количество гаплотипов (*H*), вариабельных сайтов (*S*), уровень

нуклеотидного (p) и гаплотипического (Hd) разнообразия (Hudson, 1990). В этой же программе построили графики распределения нуклеотидных замен вдоль нуклеотидных последовательностей (Rogers, Harpending, 1992) для выборок из отдельных регионов, выборок, выявленных гаплогрупп и общей популяции, а также построили графики распределения попарных генетических различий, отражающий демографическую историю популяции. Наблюдаемое распределение сравнивали с теоретически ожидаемым. Для реконструкции генеалогических связей между гаплотипами мтДНК сконструировали минимальное остовное дерево (MST, Minimum spanning tree) в программе Arlequin 3.11 (Rogers, 1992).

Таблица 4 – Полноразмерные нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК для *Metagonimus suifunensis*, использованные для популяционного анализа, с информацией об образцах

Река (регион)	Длина, п.н.	n	Номера в базе данных NCBI	Ссылка
Ген <i>cox1</i> мтДНК				
Комиссаровка (Приморский край)	1539	11	МК736830-МК736840	Tatonova et al., 2019 (настоящее исследование)
Комаровка (Приморский край)	1539	5	МК736841-МК736845	
Сорочевка (Приморский край)	1539	1	МК736846	
Арсеньевка (Приморский край)	1539	6	МК736847-МК736852	
Илистая (Приморский край)	1539	7	МК736862-МК736868	
Одарка (Приморский край)	1539	9	МК736853-МК736861	
Аньюй (Хабаровский край)	1539	1	МК736869	
Одыр (Хабаровский край)	1539	13	MN116480-MN116492	
Белая (Хабаровский край)	1539	13	MT983917-MT983929	Tatonova, Shumenko, 2021 (настоящее исследование)
Бира (Еврейская автономная область)	1539	15	MT983902-MT983916	

Окончание таблицы 4

Локалитет	Длина, п.н.	<i>n</i>	Номера в базе данных NCBI	Ссылка
Ген <i>cytb</i> мтДНК				
Комиссаровка (Приморский край)	1128	9	MT993982, MT993984-MT993991	Tatonova Shumenko, 2021 (настоящее исследование)
Комаровка (Приморский край)	1128	4	MT993992, MT993994, MT993995, MT993997	
Одарка (Приморский край)	1128	5	MT994006, MT994008-MT994011	
Илистая (Приморский край)	1128	5	MT994015, MT9940218-MT994021	
Арсеньевка (Приморский край)	1128	3	MT994002, MT994003, MT994005	
Одыр (Хабаровский край)	1128	13	MT994023-MT994035	
Белая (Хабаровский край)	1128	5	MT994056-MT994058, MT994060, MT994066	
Бира (Еврейская автономная область)	1128	12	MT994038, MT994040, MT994042-MT994051	
Ген <i>nad1</i> мтДНК				
Комиссаровка (Приморский край)	909	9	MZ852300, MZ852301-MZ852307,	Shumenko, Tatonova, 2022 (настоящее исследование)
Комаровка (Приморский край)	909	4	MZ852309-MZ852312	
Одарка (Приморский край)	909	5	MZ852316-MZ852320	
Илистая (Приморский край)	909	5	MZ852321-MZ852325	
Арсеньевка (Приморский край)	909	3	MZ852313, MZ852314, MZ852315	
Одыр (Хабаровский край)	909	13	MZ852326-MZ852338	
Белая (Хабаровский край)	909	5	MZ852351, MZ852352, MZ852353, MZ852354,	
Бира (Еврейская автономная область)	909	12	MZ852339, MZ852340, MZ852341-MZ852350	

n – число последовательностей, использованных в анализе. Названия рек соответствует названию локалитетов и субпопуляций, указанных в главе «Результаты и обсуждение».

В программе Arlequin рассчитали индексы тестов на нейтральность – Фу F_s (Fu, 1997) и Таджимы D (Tajima, 1989) для оценки генетического равновесия в популяции. Среднеквадратическое отклонение (SSD) и индекс шероховатости Харпендинга (Hri) использовали для проверки, отклоняются

ли наблюдаемые распределения от ожидаемых в соответствии с моделью роста популяции (Harpending, 1994). Оценку вероятностей наблюдаемых значений обеих статистик провели с использованием коалесцентного процесса на основе моделирования. Программу Arlequin также использовали для оценки потока генов (Nm). При анализе данного параметра учитывали, что митохондриальный геном является гаплоидным (Takahata and Slatkin 1984). В работе использовали скорость замены нуклеотидов 2,5% на миллион лет для оценки времени дивергенции видов (Attwood et al., 2008).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологические и генетические данные для представителей рода *Metagonimus*

Представители рода *Metagonimus* Katsurada, 1912 занимают следующее систематическое положение (по Pearson, 2008):

Тип Плоские черви – Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Класс Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808

Подкласс Дигенетические сосальщики – Digenea Carus, 1863

Отряд Opisthorchiida La Rue, 1957

Надсемейство Opisthorchioidea Looss, 1899

Семейство Heterophyidae Leiper, 1909

Обоснование выделения двух новых видов представлено в разделе 3.2.

Metagonimus suifunensis Shumenko, Tatonova & Besprozvannykh, 2017.

Синоним – *Metagonimus yokogawai* Katsuradai, 1912 (по Скрябин, 1930; Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных, 1987; Беспрозванных, 2000).

Первые промежуточные хозяева: *Parajuga subtegulata* Prozorova et Starobogatov, *Parajuga subextensa* Prozorova et Starobogatov, *P. subcalculus* Prozorova et Starobogatov, *P. heukelomiana* (Reeve), *P. nodosa* (Westerlung), *P. amurensis* (Gerstfeldt), *P. buettneri* (Ehrmann) (Беспрозванных, 2000)

Вторые промежуточные хозяева: *Rhodeus sericeus sericeus*, *Phoxinus lagowskii*.

Другие вторые промежуточные хозяева: *Carassius auratus gibelio*, *Cyprinus carpio haematopterus*, *Pseudorasbora parva*, *Gobio gobio cynocephalus*, *Leuciscus waleskii tumensis*, *Phoxinus czekanowskii suifunensis*, *Parasilurus asotus*, *Nemachlus barbatulus toni*, *Cobitis taenia*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Gymnogobius macrognathus*, *Rhinogobius similis*, *Percottus glehni* (Ермоленко, Беспрозванных, 1987).

Окончательный хозяин: *Rattus norvegicus* (экспериментально).

Локализация: тонкая кишка.

Интенсивность заражения: от 7 до 355 червей.

Места обнаружения. Приморский край: р. Комаровка (бассейн р. Раздольная; 43°39' северной широты, 132°07' восточной долготы), р. Комиссаровка (44°58' с.ш., 131°46' в.д.), р. Илистая (43°52' с.ш., 132°28' в.д.), р. Одарка (44°38' с.ш., 132°56' в.д.), р. Арсеньевка (44°44' с.ш., 133°34' в.д.); Хабаровский край: р. Одыр, р. Белая; Еврейская автономная область: р. Бира.

Голотип № Tr-74 (р. Комаровка) и паратипы № Tr-75-83 депонированы 20.11.2015 в паразитологическую коллекцию Зоологического Музея (Федеральный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия).

Морфологические данные. Марита (исследованный материал: 10 экземпляров) (рисунки 3а, 4а, таблица 5). Тело овально-удлиненное с заостренным передним концом. Максимальная ширина тела на уровне семенников. Кутикула покрыта мелкими шипиками. Ротовая присоска субтерминальная, поперечно-овальная. Префаринкс короткий. Глотка шаровидная, пищевод длинный. Бифуркация кишечника располагается на границе между передней и средней третями тела. Кишечник достигает уровня заднего края заднего семенника. Брюшная присоска эллиптическая, расположена в средней трети тела, справа от медианной линии тела. Передний конец брюшной присоски объединен с тонкостенным вентрогенитальным мешком. Половое отверстие открывается вентрально на уровне вентрогенитального мешка. Семенники шаровидные или овальные, расположены в задней трети тела диагонально. Передний и задний семенники располагаются слева и справа от медианной линии тела соответственно. Семенники обычно расположены близко друг к другу, но иногда они находятся на небольшом расстоянии друг от друга. Задний семенник может прилегать к заднему концу тела или находится от него на

некотором расстоянии. Семенной пузырек двураздельный, расположен в средней трети тела на медианной линии тела, перед яичником. Задняя часть семенного пузырька в 3-5 раз меньше, чем передняя. Семязвергательный канал равен длине брюшной присоски, окружен небольшим количеством простатических клеток. Яичник шаровидный или овальный, находится на границе средней и задней трети тела, на медианной линии между передним краем семенника и семенным пузырьком.

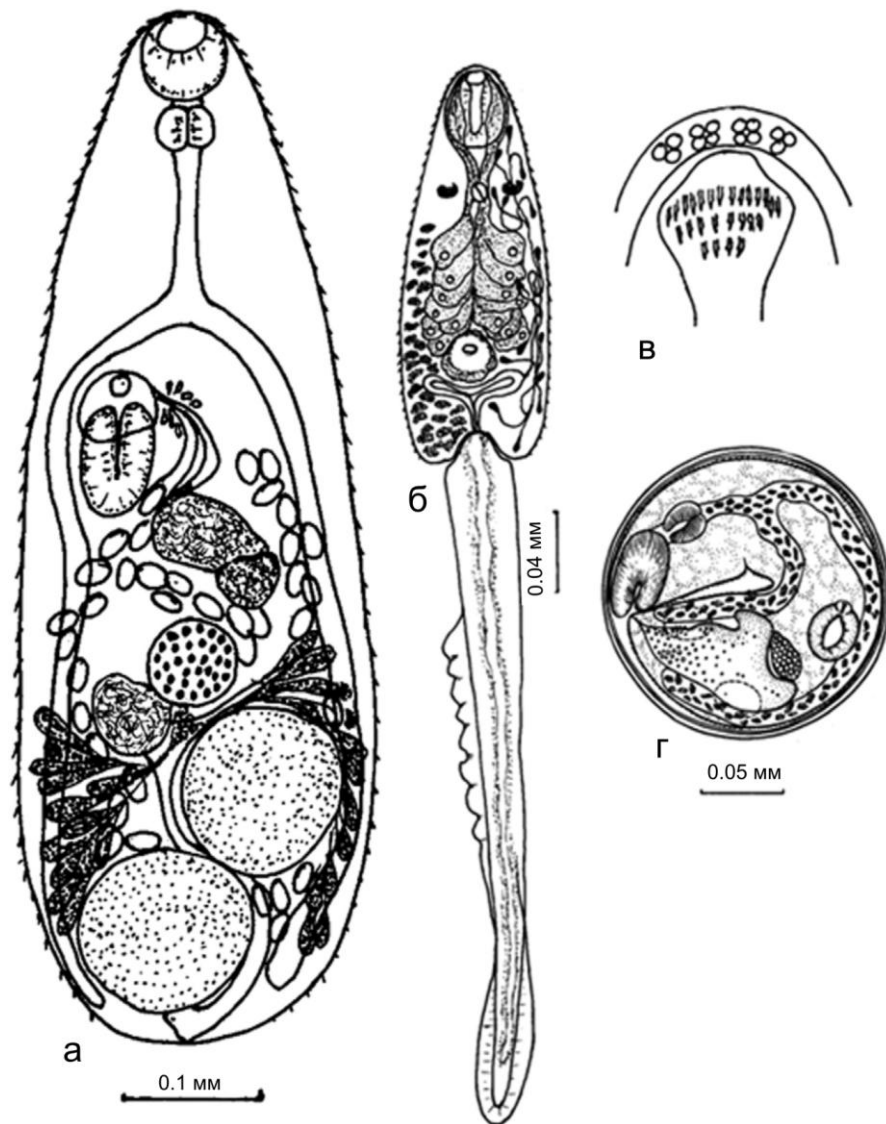


Рисунок 3 – *Metagonimus suisfunensis*: а – марита, б – церкария, в – расположение крючьев ротовой присоски церкарий и пор протоков желез, г – метациркария

Петли матки располагаются от уровня середины заднего семенника до уровня вентрогенитального комплекса, могут проходить между семенниками. Семяприемник расположен кзади справа от яичника. Яйца $0,028-0,029 \times 0,018-0,019$, с крышечкой, светло-желтые. Желточные фолликулы лежат латерально от уровня середины яичника до уровня задней трети заднего семенника. Желточный резервуар находится между яичником, семяприемником и передним семенником. Экскреторный пузырь Y-образный, достигает переднего края переднего семенника.

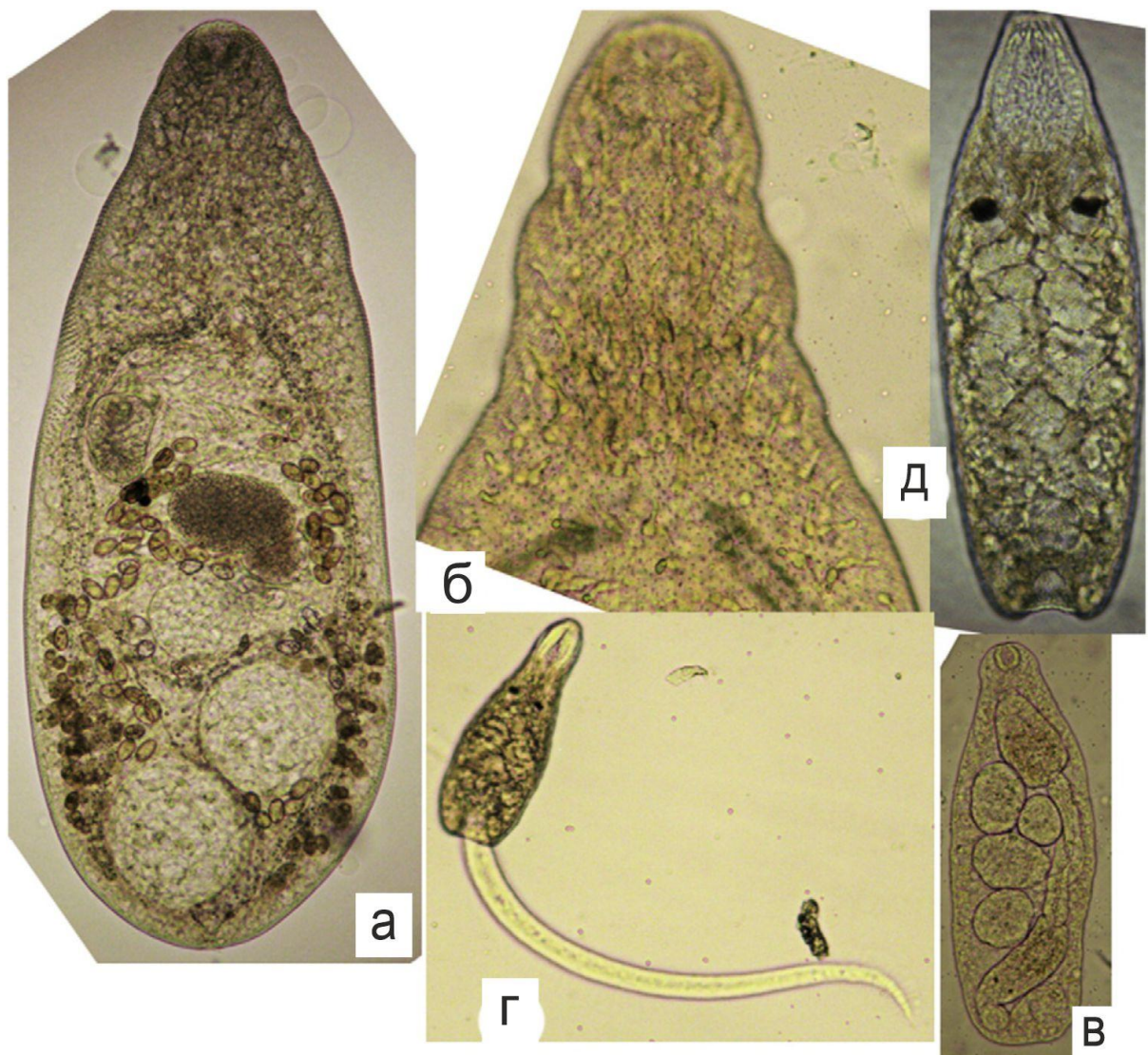


Рисунок 4 – *Metagonimus suisfunensis*: а – марита, б – передний конец тела, в – редия, г – церкария, д – тело церкарии

Таблица 5 – Размеры половозрелых *M. suifunensis* и морфометрически близких видов *Metagonimus* (в мм)

Признак	<i>M. suifunensis</i> *, р. Комаровка, Приморский край (настоящее исследование)	<i>M. yokogawai</i> , Приморский край, Россия (Беспозванных и др., 1987)	<i>M. yokogawai</i> , Япония (Shimazu, Kino, 2015)	<i>M. takahashii</i> , Япония (Saito, 1997)	<i>M. miyatai</i> , Япония (Saito, 1997)
Тело, Д	0,693-0,785	0,920-1,010	0,753-1,074	0,863-1,193	0,867-1,300
Тело, Ш	0,277-0,339	0,300-0,400	0,314-0,424	0,444-0,571	0,399-0,627
Передний конец тела до брюшной присоски	0,296-0,316	–	0,220-0,345	–	–
Соотношение переднего конца /длины тела, %	38-43,5	–	28-29	–	–
Ротовая присоска, Д	0,046-0,054	0,060-0,070	0,048-0,059	0,038-0,057	0,041-0,065
Ротовая присоска, Ш	0,062-0,065	0,075-0,085	0,059-0,065	0,065-0,081	0,061-0,093
Глотка, Д	0,035-0,039	0,035-0,038	0,035-0,048	0,041-0,051	0,036-0,060
Глотка, Ш	0,035-0,039	0,035-0,038	0,036-0,059	0,025-0,044	0,024-0,051
Брюшная присоска, Д	0,077-0,096	0,110-0,120**	0,710-0,092	0,096-0,114	0,084-0,131
Брюшная присоска, Ш	0,058-0,062	0,600-0,660**	0,048-0,057	0,066-0,079	0,065-0,090
Пищевод	0,089-0,112	0,081	0,063-0,119		0,049-0,120
Предглотка	0,008-0,011	–	–	–	–
Яичник, Д	0,077-0,092	0,100×0,090	0,068-0,103	0,067-0,124	0,084-0,146
Яичник, Ш	0,085-0,104	0,100×0,090	0,048-0,079	0,075-0,123	0,086-0,127
1й семенник, Д	0,096-0,131	0,096-0,110	0,111-0,151	0,180-0,265	0,176-0,302
1й семенник, Ш	0,100-0,135	0,090-0,100	0,068-0,135	0,127-0,178	0,146-0,230
2й семенник, Д	0,104-0,135	–	0,095-0,175	0,211-0,286	0,206-0,419
2й семенник, Ш	0,108-0,154	–	0,055-0,127	0,148-0,217	0,126-0,254
Вентрогенитальный комплекс, Д	0,039-0,050	–	–	–	–
Вентрогенитальный комплекс, Ш	0,058-0,065	–	–	–	–
Соотношение длины присосок	1:1,50-1,85	–	1:1,36-1,93	–	–
Соотношение ширины присосок	1:0,81-1,0	–	1:0,77-0,95	–	–
Яйца, Д	0,027-0,031	0,028	0,025-0,028	0,029-0,036	0,026-0,032
Яйца, Ш	0,015-0,019	0,018-0,019	0,014-0,016	0,018-0,022	0,016-0,019

* – обоснование выделения вида представлено в разделе 3.2. ** – вентрогенитальный комплекс, Д – длина, Ш – ширина.

По данным сканирующей электронной микроскопии шипики на вентральной поверхности половозрелых особей *Metagonimus suisfunensis* многочисленны, располагаются в поперечных рядах и более плотно прилегают к друг к другу, чем на вентральной поверхности заднего конца тела. Шипики широкие, лопатовидные, с усеченным передним концом, состоят из 3-5 продольных ребер, плотно прилегающих друг к другу, свободные концы ребер имеют зазубрины на переднем конце (рисунок 5).

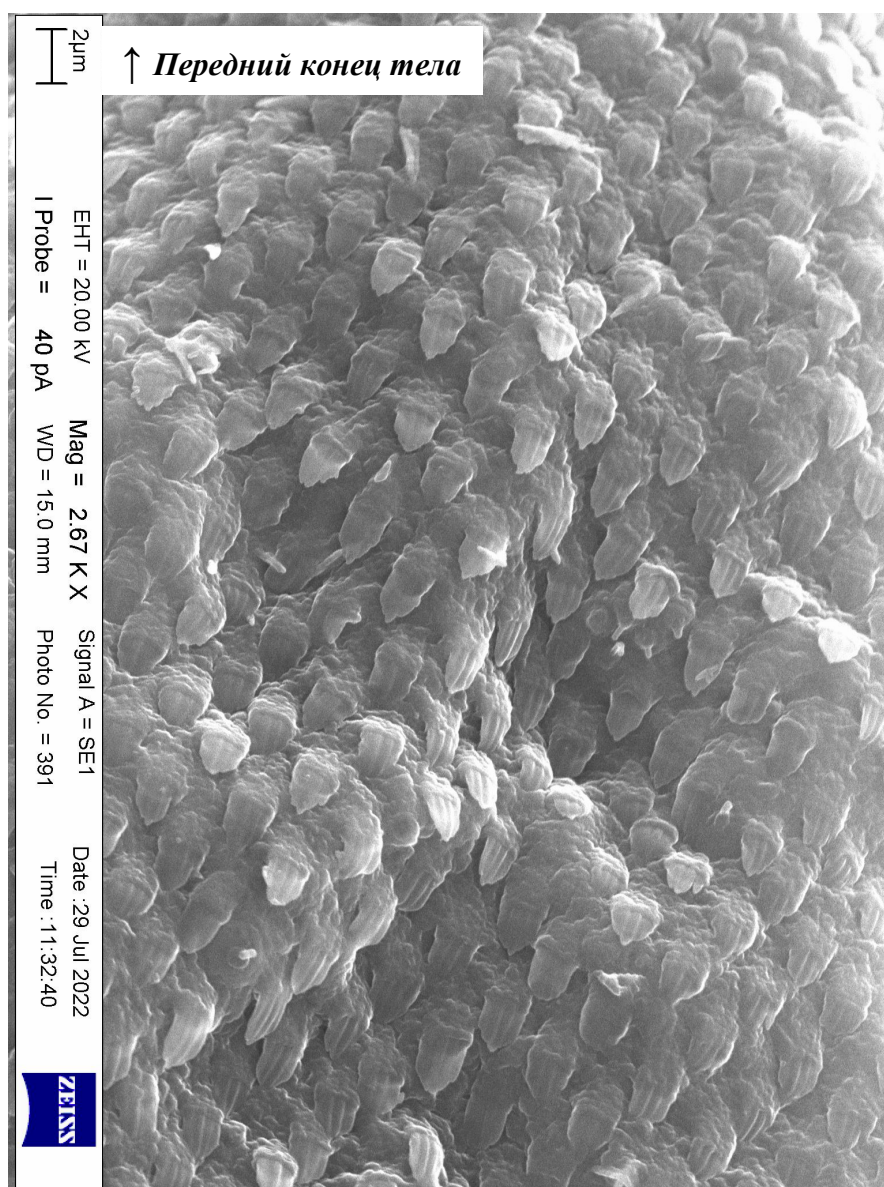


Рисунок 5 – Вентральная поверхность переднего конца тела мариты *Metagonimus suisfunensis* (электронная фотография)

Сзади от вентрогенитального комплекса шипики также многочисленны, с 3-5 продольными ребрами, имеющими зазубрины на переднем конце, но в отличие от расположенных на вентральной поверхности шипиков, они клювовидные и имеют меньшую ширину в основании (рисунок 6).



Рисунок 6 – Участок тела мариты *Metagonimus suisfunensis* в области вентрогенитального комплекса (электронная фотография)

По направлению к заднему концу тела размеры шипиков и количество ребер в каждом из них постепенно уменьшается, а на самом заднем конце шипики редко расположены, уже относительно первых двух вариантов, клювовидные, ярко выраженные ребра отсутствуют, но имеются 2-3 зазубрины на переднем конце каждого шипика (рисунок 7).

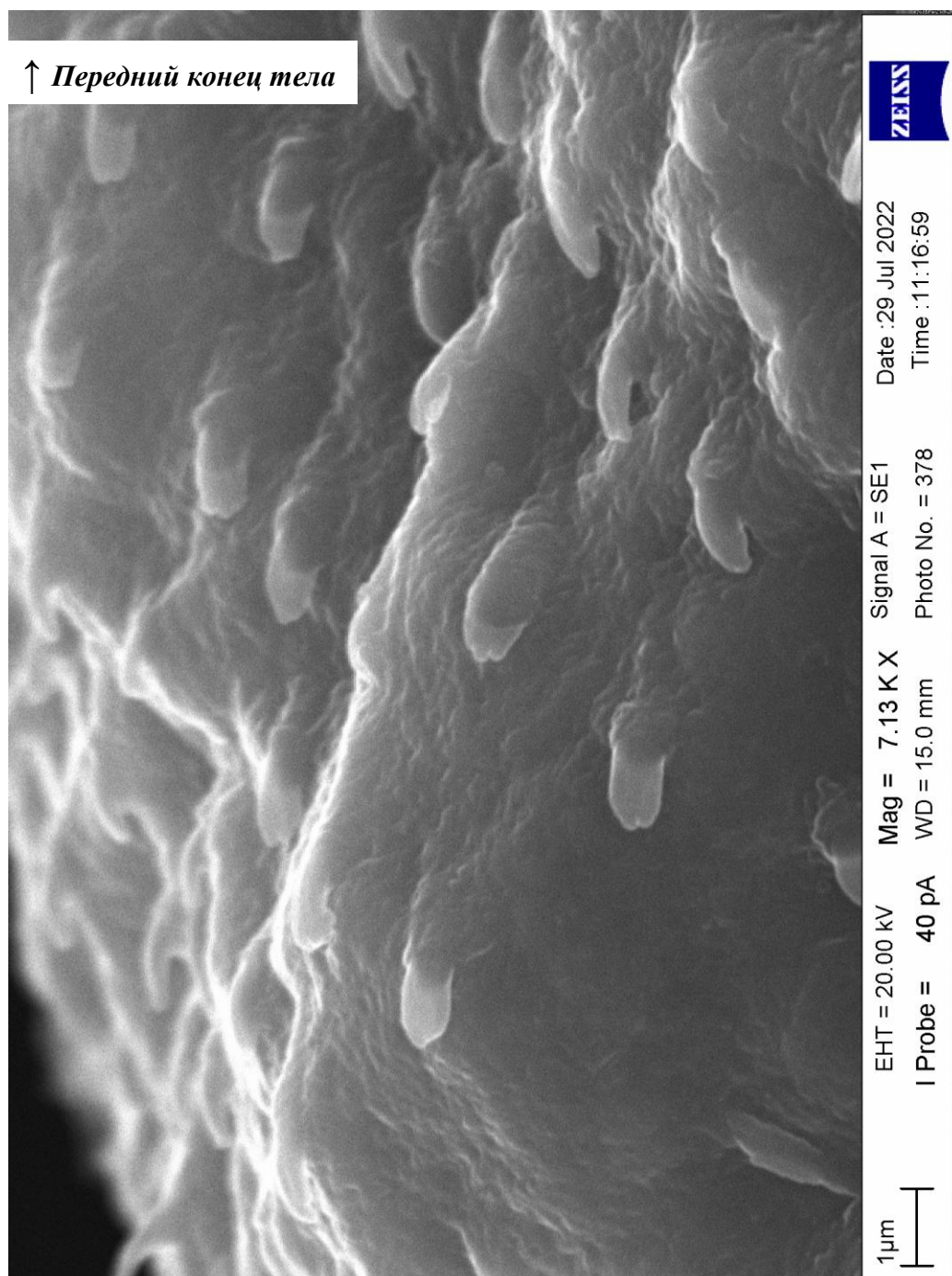


Рисунок 7 – Вентральная поверхность заднего конца тела марицы *Metagonimus suifunensis* (электронная фотография)

Редия (исследованный материал: 10 экземпляров) (рисунок 4в). Тело в форме вытянутого овала, $0,70-1,20 \times 0,10-0,20$. Глотка $0,25-0,33$ в диаметре. Кишечник короткий, мешковидный.

Церкария (исследованный материал: 10 экземпляров) (рисунки 3б, 4г, д, таблица 6).

Таблица 6 – Размеры церкарий *M. suifunensis* и морфометрически близких видов *Metagonimus* (в мм)

Признак	<i>M. suifunensis</i> (настоящее исследование)	<i>M. yokogawai</i> (Беспрованн ых, 2000)	<i>M. yokogawai</i> (Ito, 1964с)	<i>M. takahashii</i> (Ito, 1964с)	<i>M. miyatai</i> (Shimazu, Urabe, 2002)
Тело, Д	0,180-0,230	0,173-0,230	0,175-0,238	0,203-0,269	0,196-0,230
Тело, Ш	0,070-0,078	0,067-0,078	0,056-0,077	0,070-0,098	0,056-0,066
Ротовая присоска, Д	0,039-0,042	0,039-0,041	0,041-0,046	0,045	0,034-0,038
Ротовая присоска, Ш	0,027-0,031	0,028-0,030	0,030-0,035	0,041	0,030-0,032
Брюшная присоска, Д	0,019-0,020	0,018	0,019-0,021	0,019-0,021	0,016-0,020
Брюшная присоска, Ш	0,020-0,023	0,021	0,019-0,021	0,019-0,021	0,016-0,020
Хвост, Д	0,370-0,417	0,350-0,400	0,340-0,420	0,420-0,520	0,343-0,390
Хвост, Ш	0,027-0,035	0,028-0,033	0,031-0,035	0,030-0,039	–
Крючья	26; 4 в 1м ряду	26; 4 в 1м ряду	около 30; 4 в 1м ряду	5-6 в 1м ряду	4 в 1м ряду
Экскреторная формула	$2[(3+3)+(3+3+3)]=30$	$2[(3+3)+(3+3+3)]=30$	$2[(3+3+3)+(3+3+3)]=36$ (Saito, 1973)	$2[(3+3+3)+(3+3+3)]=36$ (Shimazu, Kino, 2015)	$2[(3+3+3)+(3+3+3)]=36$ (Saito et al., 1997) $2[(2+2+2)+(2+2+2)]=24$ (Shimazu, Urabe, 2002)

Д– длина, Ш – ширина.

Тело удлинённое, с заостренным передним концом, содержит коричневатый пигмент, покрыто шипиками. Имеются два пигментных глазка на дорсальной стороне передней трети тела. Ротовая присоска овальная, субтерминальная с 26 крючьями, расположенными в 3 ряда (4 в 1-м, 8 во 2-м, 14 в 3-й) (рисунок 3в). Фаринкс на уровне глазков. Кишечник не сформирован. Брюшная присоска недоразвита. Расстояние от переднего конца тела до брюшной присоски $0,09-0,12$, зачаток половой системы на уровне брюшной присоски. Железы проникновения, расположены перед брюшной присоской по 7 с каждой стороны от медианной линии. Протоки

этих желез открываются кпереди от ротовой присоски по формуле 3 + 4 + 4 + 3. Цистогенные железы с обеих сторон тела, от начала средней трети до заднего конца тела. Экскреторный пузырь Y-образной формы с толстыми стенками. Хвост с мембраной, его основание входит хвостовую камеру.

Метацеркария (исследованный материал: 10 экземпляров). Циста 0,168–0,178 в диаметре, уплощенная в дорсо-вентральном направлении. Тело коричневое, покрыто тонкими шипиками. Ротовая присоска 0,035–0,056 × 0,030–0,035, округлая или овальная. Фаринкс сферической формы, 0,024–0,026 в диаметре. Префаринкс короче пищевода. Просвет кишечника заполнен гранулами. Брюшная присоска 0,037 × 0,026–0,030 с зачатком вентрогенитального комплекса расположена медианно в начале задней трети тела. Зачаток яичника округлой или поперечно-овальной формы, 0,018 × 0,028, спереди экскреторного пузыря. Два зачатка семенников, 0,028 × 0,021–0,026, в задней трети тела, по обе стороны экскреторного пузыря. Экскреторный пузырь Y-образный.

Молекулярно-генетические данные. После выравнивания длина пяти проанализированных частичных последовательностей гена 28S рРНК для *M. suifunensis* составила 1402 п.н. (Таблица 3). Нуклеотидный состав: А – 21,5%; Т – 24,3%; Г – 31,9%; С – 22,3%. Эти последовательности идентичны внутри вида.

Длина полученных 64 полных последовательностей участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК составила 1134 п.н. (Таблица 3), нуклеотидный состав данного участка А – 18,4%; Т – 30,7%; G – 27,2%; С – 23,6%. Длина участка ITS1 рДНК составила 687 п.н. Обнаружена только одна замена А→G в позиции 390 п.н. у образца КХ387507 (р. Арсеньевка, Приморский край). Длина участка ITS2 рДНК – 287 п.н. Выявлен внутригеномный полиморфизм G/A в позициях 38 и 264 п.н. в образцах КХ387502 (р. Арсеньевка, Приморский край) и КХ387484 (р. Комиссаровка, Приморский край) соответственно.

Комбинированные полноразмерные последовательности трех митохондриальных генов (*cytb*, *nad1*, и *cox1*, Таблица 4) имеют общую длину

3576 п.н., что составило 23,4% длины от единственного полного митохондриального генома, представленного в базе данных NCBI для типового вида рода *Metagonimus* (*M. yokogawai*, KC330755, без подтверждающей публикации). Число варибельных сайтов в этой последовательности – 85, из их 18 информативных.

Длина 56 полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *cox1* мтДНК *M. suifunensis* составила 1539 п.н. (Таблица 4), что соответствует длине последовательности *M. yokogawai* (KC330755). Для *M. suifunensis* стоп-кодон TAG. Нуклеотидный состав гена *cox1* мтДНК этого вида Т – 37,9%; С – 15,9%; А – 17,9%; G – 28,3%. Полученные последовательности отличались друг от друга на 19 транзиций и одну трансверсию (А→С). Три из них были парсимоний-информативными. По две несинонимичных замены обнаружено в двух образцах из р. Арсеньевка (Приморский край) и в двух образцах из р. Одыр (Хабаровский край). Уровень отличий внутри полной популяции по гену *cox1* мтДНК составил 0,9% ($\pm 0,2\%$).

Длина полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *cytb* мтДНК составила 1128 п.н. (Таблица 4), что соответствует длине этого гена *M. yokogawai* (KC330755). Стоп-кодоном этого гена для *M. suifunensis* является триплет TAA. Нуклеотидный состав: Т – 41,2%; С – 14,8%; А – 17,0%; G – 27,1%. Между *M. suifunensis* и *M. yokogawai* обнаружена 161 фиксированная нуклеотидная замена и 23 фиксированные несинонимичные замены. В последовательностях гена *cytb* мтДНК *M. suifunensis* (внутри вида) выявлено 36 транзиций и 6 трансверсий (1С → G, 2 G → С, 1 С → А и 2 Т → G); 10 из них были парсимоний-информативными. Для полных последовательностей гена *cytb* мтДНК обнаружено 30 полиморфных сайтов, из них 7 информативных; 13 несинонимичных замен, 4 из которых были информативными. Уровень отличий внутри выборки по гену *cox1* мтДНК составил 1,7% ($\pm 0,5\%$).

Длина 56 полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК *M. suifunensis* составила 909 п.н. (Таблица 4), что соответствует

длине этого гена *M. yokogawai* (KC330755). Стоп-кодон – ТАА. Нуклеотидный состав *M. suifunensis* Т – 42%; С – 12,4%; А – 16,0 %; G – 29,6%. Для популяции этого вида выявлено 27 переменных сайтов, 7 из которых были информативными; 9 замен были несинонимичными, одна из них информативная. Уровень отличий внутри выборки по гену *cox1* мтДНК составил 1,5% ($\pm 0,4\%$).

Metagonimus pusillus Tatonova, Shumenko & Besprozvannykh, 2018. Синоним – *Metagonimus katsuradai* Izumi, 1935 (по Беспрозванных, 1987, 2000).

Локализация: тонкий кишечник.

Интенсивность инфекции: 8 червей.

Первый промежуточный хозяин. *Parajuga subtegulata*, *Parajuga subextensa* (Беспрозванных, 1987, 2000).

Второй промежуточный хозяин. *Rhodeus sericeus sericeus*.

Другие вторые промежуточные хозяева: *Leuciscus waleskii tumensis*, *Pseudorasbora parva*, *Carassius auratus gibelio*, *Cyprinus carpio haematopterus*, *Misgurnus anguillicaudatus* (Ермоленко, Беспрозванных, 1987).

Место обнаружения. Река Большая Уссурка, Приморский край, юг Дальнего Востока России; 45°57' северной широты, 133°53' восточной долготы.

Голотип № Tr-114 и паратипы № Tr-115-118 хранятся в паразитологической коллекции Зоологического музея (Федеральный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия).

Морфологические данные. Марита (исследованный материал: 5 экземпляров) (рисунок 8, таблица 7). Тело мариты овально-удлиненное с заостренным передним концом. Максимальная ширина тела мариты находится на уровне семенников. Кутикула покрыта тонкими шипиками. На переднем конце тела под тегументом имеются многочисленные железы,

протоки этих желез открываются на вентральной поверхности передней половины переднего конца тела. Ротовая присоска субтерминальная, поперечно-овальная. Префаринкс короткий. Фаринкс сферический или поперечно-овальный, пищевод длинный. Бифуркация кишечника располагается на границе передней и средней третей тела. Ветви кишечника достигают уровня заднего края правого семенника.

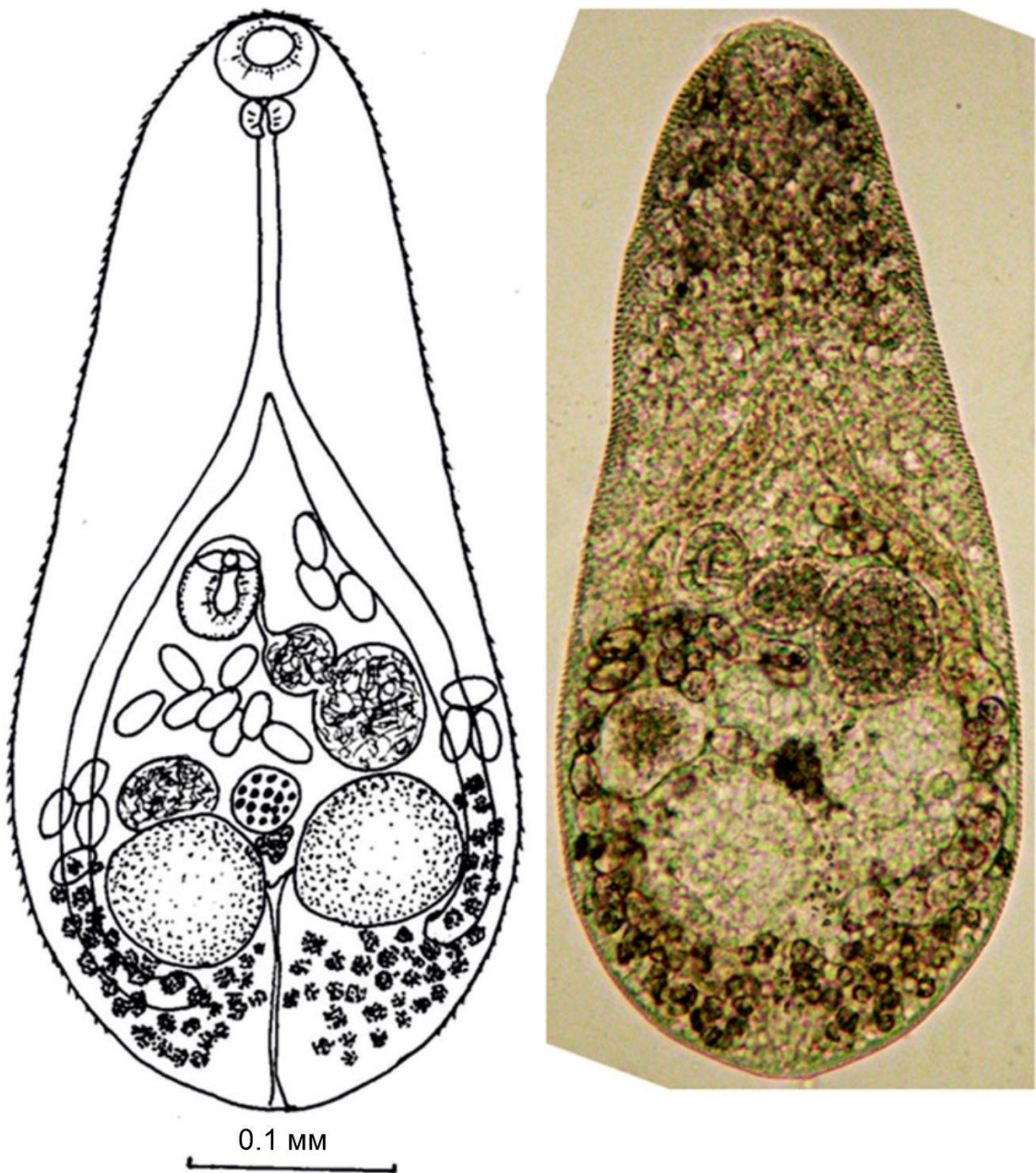


Рисунок 8 – *Metagonimus pusillus*, марида

Брюшная присоска эллиптическая, в средней трети тела справа от медианной линии. Передний конец брюшной присоски объединен с тонкостенным вентрогенитальным мешком. Половая пора открывается вентрально, на уровне вентрогенитального мешка. Семенники округлые или овальные, расположены параллельно или диагонально в задней трети тела. Семенники располагаются на небольшом расстоянии друг от друга. Семенной пузырек двураздельный, находится в средней трети тела, перед яичником. Передняя часть семенного пузырька в 2-3 раза меньше задней части. Семявыводящий проток короткий. Яичник шаровидный, лежит на границе средней и задней третей тела, по медианной линии между левым семенником и семяприемником. Петли матки располагаются дорсальнее семенников и яичника, заполняют пространство от уровня середины брюшной присоски до уровня заднего края правого семенника. Семяприемник находится справа от яичника. Яйца с крышечкой, светло-желтые. Желточные фолликулы расположены латерально, от уровня средней части яичника до заднего конца тела. Желточный резервуар находится между яичником, семяприемником и левым семенником. Экскреторный пузырь Y-образный.

Молекулярно-генетические данные. После выравнивания для *M. pusillus* длина частичных последовательностей гена 28S рРНК составила 1403 п.н. (Таблица 3). Нуклеотидный состав последовательностей этого вида: А – 21,8%; Т – 24,5%; G – 31,6%; С – 22,1%. Полученные последовательности гена 28S рРНК идентичны друг другу.

Длина двух полных последовательностей участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК *M. pusillus* составила 1144 п.н. (Таблица 3). Нуклеотидный состав участка: А – 19,1%; Т – 30,5%; G – 26,7%; и С – 23,7%. Последовательности не отличались друг от друга.

Длина частичной последовательности гена *cox1* мтДНК составила 339 п.н. (Таблица 3). Две последовательности *M. pusillus* идентичны друг другу.

Таблица 7 – Размеры половозрелых *M. pusillus* и морфометрически близких видов *Metagonimus* (в мм)

Признак	<i>M. pusillus</i> , Приморский край, Россия (настоящее исследование)	<i>M. katsuradai</i> , Приморский край, Россия (Беспрозванных, 1987)	<i>M. katsuradai</i> , Япония (Izumi, 1935 процитировано Ito, 1964b)	<i>M. katsuradai</i> , Япония (Shimazu, 2003)	<i>M. otsurui</i> , Япония (Shimazu, Urabe, 2002)	<i>M. hakubaensis</i> , Япония (Shimazu, 1999)	<i>M. minutes</i> , Япония (Katzuta, 1932, цит. по Морозов, 1952)
Тело, Д	0,420-0,527	0,420-0,440	0,300-0,500	0,390-0,530	0,304-0,500	0,490-0,640	0,432-0,544
Тело, Ш	0,193-0,216	0,190-0,200	0,200-0,300	0,244-0,310	0,190-0,300	0,280-0,420	0,252-0,396
Передний конец тела до брюшной присоски	0,177-0,250	–	–	–	–	–	–
Соотношение переднего конца /длины тела (%)	1:2,10-2,37 (42–47,4%)	–	–	–	–	–	–
Ротовая присоска, Д	0,035-0,042	0,038-0,055	0,043	0,038-0,046	0,036-0,050	0,043-0,058	0,030-0,048
Ротовая присоска, Ш	0,042-0,046	0,038-0,055	0,050	0,042-0,050	0,042-0,060	0,058-0,078	0,030-0,048
Глотка, Д	0,019-0,023	–	–	0,026-0,030	0,022-0,034	0,027-0,035	0,027-0,045
Глотка, Ш	0,023-0,027	–	–	0,024-0,028	0,022-0,032	0,019-0,031	0,021-0,030
Брюшная присоска, Д	0,039-0,046	0,038-0,042	0,030-0,040	0,040-0,048	0,036-0,050	0,051-0,070	0,051-0,060
Брюшная присоска, Ш	0,031-0,039	0,032	0,024-0,030	0,032-0,040	0,028-0,046	0,039-0,051	0,033-0,051
Пищевод	0,081-0,127	–	–	0,064-0,114	0,030-0,090	0,020-0,094	0,060
Яичник, Д	0,030-0,035	0,038-0,041	–	0,030-0,050	0,030-0,060	0,080-0,120	–
Яичник, Ш	0,027-0,039	0,038-0,043	–	0,050-0,080	0,030-0,080	0,070-0,100	–
Левый семенник, Д	0,058-0,069	0,051	–	0,060-0,110	0,060-0,120	0,100-0,150	0,077-0,087
Левый семенник, Ш	0,058-0,081	0,050	–	0,056-0,094	0,050-0,090	0,070-0,120	–
Правый семенник, Д	0,073-0,077	0,057	–	0,070-0,126	0,068-0,120	0,100-0,160	–
Правый семенник, Ш	0,058-0,077	0,061	–	0,064-0,094	0,050-0,100	0,080-0,120	–
Вентрогенитальный	0,012	–	–	–	–	–	–
Вентрогенитальный	0,023	–	–	–	–	–	–
Соотношение длины	1:0,9-1,0	–	–	1:0,74-0,92	1:0,69-1,10	1:0,75-1,06	–
Соотношение ширины	1:1,2-1,5	–	–	–	–	–	–
Яйца, Д	0,027-0,030	0,026	0,026-0,028	0,026-0,032	0,026-0,030	0,028-0,034	0,023
Яйца, Ш	0,015-0,019	0,017	0,015-0,016	0,014-0,016	0,014-0,020	0,016-0,020	0,013

Д – длина, Ш – ширина.

3.2. Обоснование валидности дальневосточных представителей рода *Metagonimus*

Анализ собственных результатов, приведенных выше, и ранее опубликованных работ (Скрябин, 1930; Saito et al., 1997; Shimazu, 1999; Shimazu, Urabe, 2002; Shimazu, 2015) показывает, что виды рода *Metagonimus* можно разделить на 2 группы (таблицы 5, 7): более крупные с длиной тела более 0,65 мм – *M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai* и более мелкие – *M. hakubaensis*, *M. minutus*, *M. katuradai*, *M. otsurui*, *M. ovatus*. По размерам тела *M. suifunensis* соответствует первой группе трематод, а *M. pusillus* относится ко второй. В связи с этим, сравнение морфологических параметров исследуемых трематод произведено только с червями внутри групп.

Морфологические и морфометрические показатели церкарий и половозрелых особей *M. suifunensis*, обнаруженных в настоящем исследовании, совпадают с данными для червей, ранее известных на ДВ России как *M. yokogawai* (Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных и др., 1987). Церкарии, от которых нами были получены половозрелые черви, как и церкарии дальневосточных червей, причисленных ранее к виду *M. yokogawai* (Беспрозванных и др., 2000), имеют одинаковое количество ротовых крючьев и их расположение, а также не имеют хиатуса в размерах (таблица 6). Между половозрелыми особями червей, полученных в настоящем исследовании и изученных ранее на ДВ России, имеются незначительные расхождения в размерах тела и органов (таблица 5). Но это, вероятнее всего, связано с различными темпами роста отдельных особей от метацеркарии до половозрелой стадии в разных лабораторных исследованиях. Исходя из выше сказанного, обсуждаемые черви принадлежат одному виду.

В опубликованных ранее работах (Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных и др., 1987) принадлежность дальневосточных червей к виду

M. yokogawai была ошибочно обоснована морфометрическим сходством с особями этого вида из типового места обнаружения (Япония). Более того, по большинству метрических показателей половозрелые черви из настоящего исследования сходны и с *M. takahashii* и *M. miyatai* (таблица 5). Исходя из морфологических критериев, используемых для дифференциации видов рода *Metagonimus* в работе Порнруситайратна с соавторами (Pornruseetairatnet et al., 2016), взрослые особи *M. suifunensis* идентичны *M. miyatai*, но отличаются от *M. yokogawai* и *M. takahashii* расположением желточных фолликул (желточные фолликулы не достигают задней трети правого семенника vs желточные фолликулы выходят за пределы заднего края правого семенника). Кроме того, у червей *M. yokogawai* матка занимает пространство от брюшной присоски до переднего края семенников, а у дальневосточных червей ее петли проходят между семенниками. Что касается церкарий, то все перечисленные виды также имеют сходные показатели (таблица 6), однако *M. suifunensis* отличается от них по количеству крючьев на ротовой присоске.

При анализе морфометрических показателей в данном исследовании установлено, что *M. suifunensis* обладает меньшими размерами тела, чем все упомянутые выше виды – *M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai* (таблица 5). Наряду с этим, *M. suifunensis* отличается от *M. yokogawai* большими показателями соотношения длины переднего конца тела к его длине и большим размером яиц (таблица 5). От *M. takahashii* описываемый нами вид помимо указанного выше расположения семенников отличается меньшим размером яиц (таблица 5).

Отличия *M. suifunensis* от других видов рода *Metagonimus* (*M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai*) хорошо просматриваются и в деталях тонкого строения тегументальных шипиков на разных участках поверхности тела. Так, например, шипики у ротовой присоски *M. suifunensis* имеют более заостренную форму, чем у *M. yokogawai* и *M. takahashii*. Шипики на вентральной поверхности переднего конца тела *M. suifunensis*

более узкие и выгнутые, чем у *M. yokogawai*, состоят из 3-5 ребер, границы между которыми выражены слабо, в отличие от шипиков *M. yokogawai*, состоящих из 7-9 хорошо выраженных ребер (Lee et al., 1987). Шипики на аналогичном участке тела *M. miyatai* и *M. takahashii* гребневидной формы, состоят из 9-12 и 9-11 ребер соответственно, свободные концы которых смыкаются неплотно. Шипики у вентрогенитального комплекса *M. suifunensis* более узкие и заостренные, чем у перечисленных выше видов, состоят из 3-4 плотно сомкнутых ребер. Тегументальные шипики *M. yokogawai* около брюшной присоски также состоят из плотно сомкнутых ребер, но их количество достигает 5-6, и они имеют закругленную форму (Lee et al., 1987). Шипики *M. miyatai* и *M. takahashii* на том же участке тела более широкие и округлые, чем у перечисленных выше червей. На вентральной поверхности заднего конца тела шипики дальневосточных червей узкие и редко расположены, состоят из трех плотно сомкнутых ребер, желобки между которыми выражены слабо или отсутствуют. На том же участке тела у *M. yokogawai* шипики имеют 2-5 ребер, а у *M. takahashii* и *M. miyatai* шипики состоят из большего количества ребер, заканчивающихся 5-7 и 5-6 заостренными зубцами соответственно (Chai et al., 2000). Таким образом, совокупность всех морфометрических и морфологических показателей свидетельствует о валидности дальневосточных червей, которым мы присвоили название *M. suifunensis*.

Видовая самостоятельность дальневосточных червей, обозначенных как *M. suifunensis*, также подтверждается и с использованием молекулярно-генетических данных. На реконструкциях филогенетических связей внутри рода *Metagonimus* на основе последовательностей гена 28S рРНК, участка ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК, *M. suifunensis* формирует отдельные ветви с высокой поддержкой (рисунки 9-11). На реконструкции по гену 28S рРНК *M. suifunensis* формирует общий кластер с *M. miyatai* и отличается от него на 0,7%.

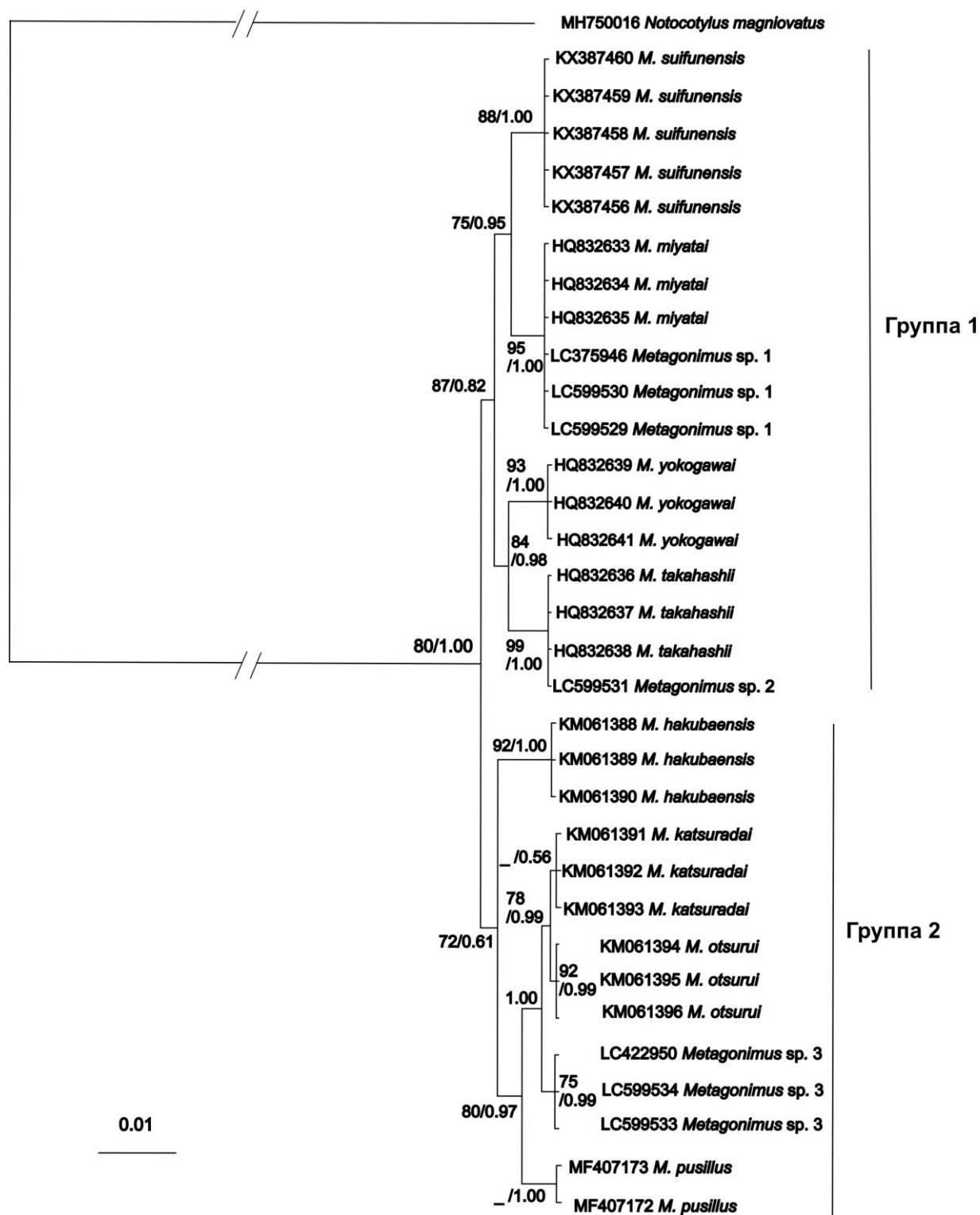


Рисунок 9 – Филогенетические отношения видов рода *Metagonimus* на основе частичных последовательностей гена 28S рРНК. В узлах ветвей указаны значения бутстреп-поддержки/апостериорной вероятности (> 50%) для деревьев ML/BI соответственно. Внешняя группа – *Notocotylus magniovatus* (MH750016)

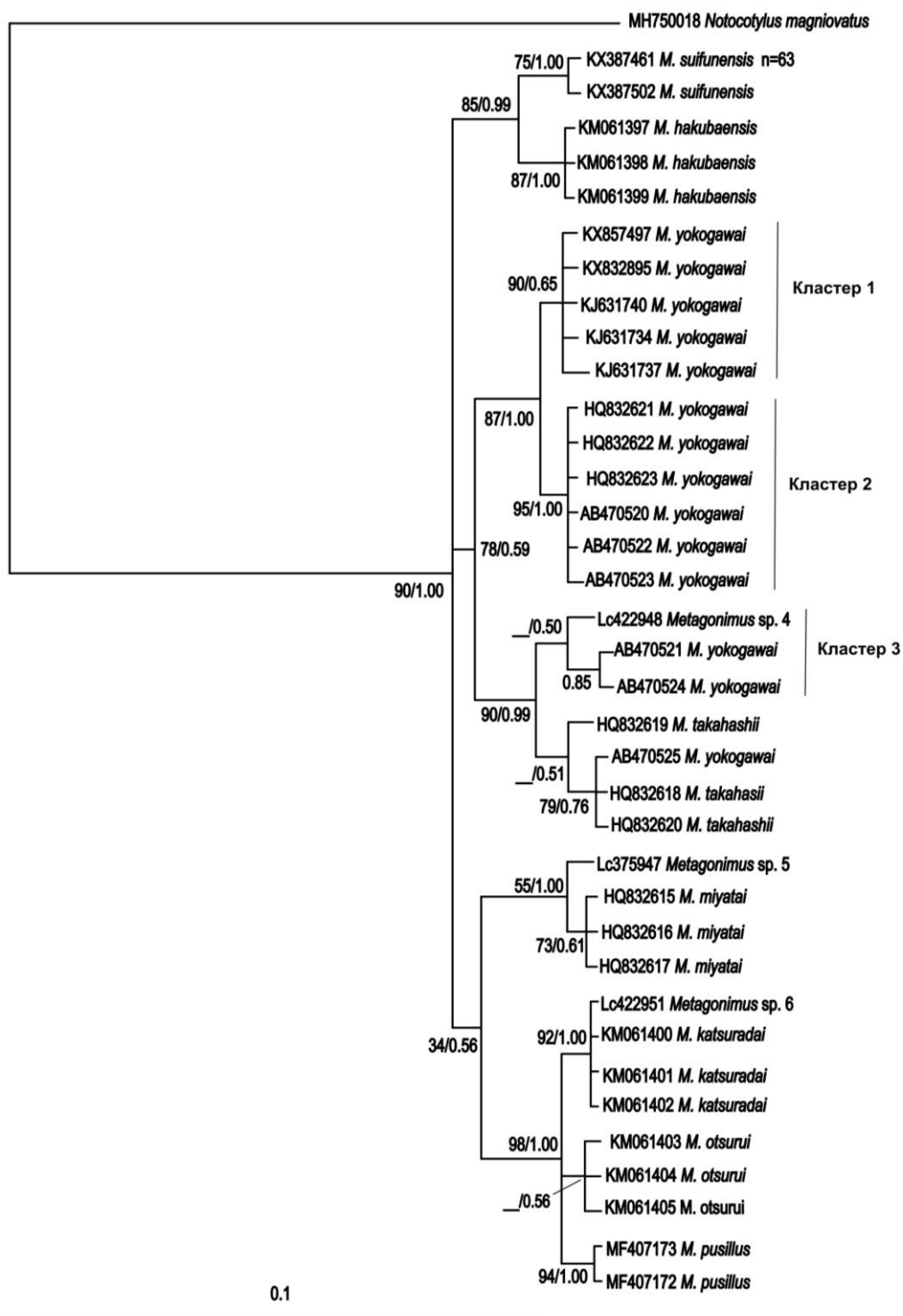


Рисунок 10 – Филогенетические отношения видов рода *Metagonimus* на основе последовательностей участка ITS2 рДНК. В узлах ветвей указаны значения бутстреп-поддержки/апостериорной вероятности (> 50%) для деревьев ML/BI соответственно. Внешняя группа – *Notocotylus magniovatus* (MH750018). *n* – количество идентичных последовательностей

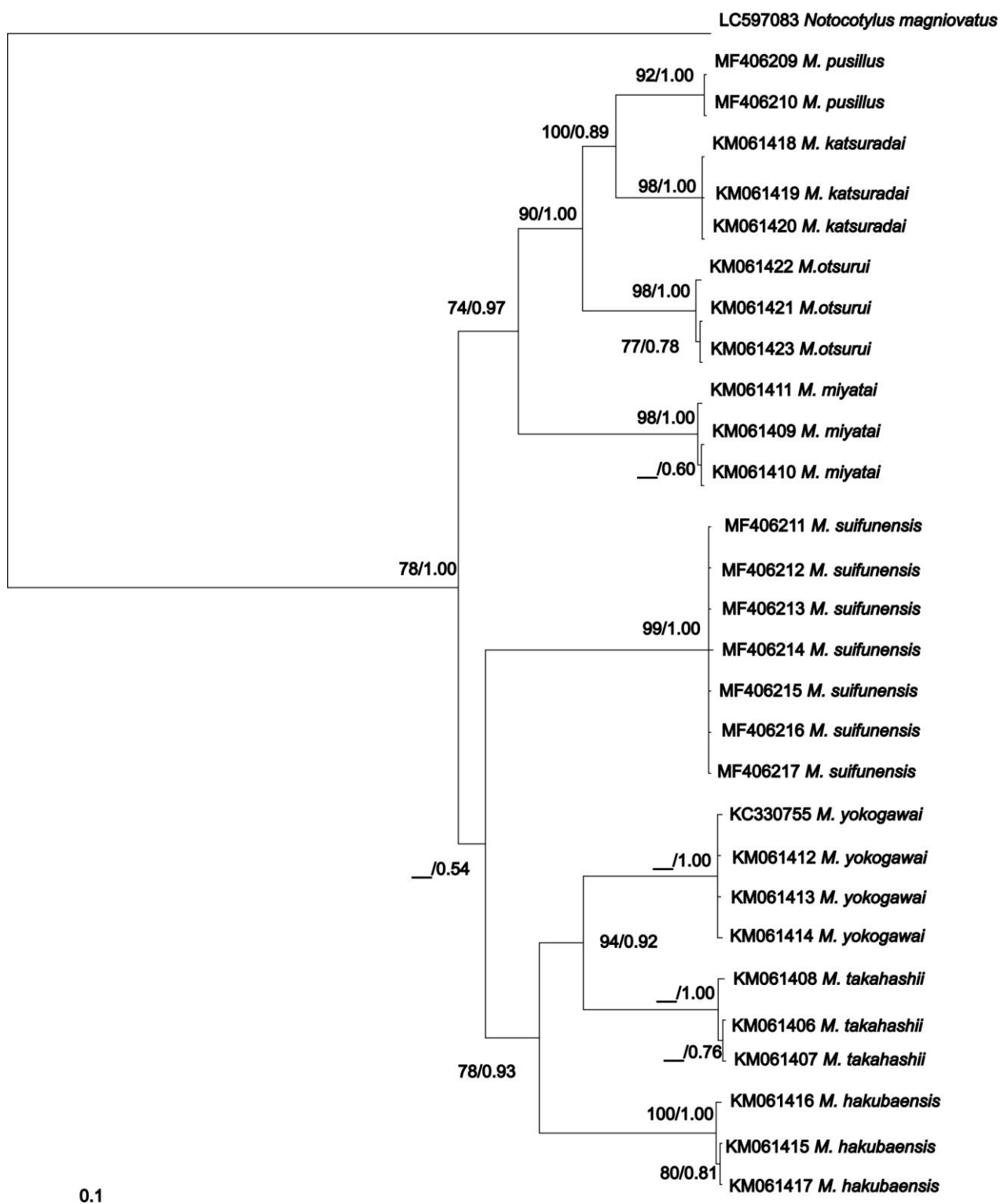


Рисунок 11 – Филогенетические отношения видов рода *Metagonimus* по данным гена *cox1* мтДНК, в узлах ветвей указаны значения бутстреп-поддержки/апостериорной вероятности (> 50%) для деревьев ML/BI соответственно. Внешняя группа – *Notocotylus magniovatus*

Дерево, построенное по данным участка ITS2 рДНК, показало, что образцы *M. suifunensis* сформировали общий кластер с *M. hakubaensis*, от которого отличаются на 1,2%. На дереве по митохондриальному маркеру *M. suifunensis* образовал внешнюю ветвь по отношению к кластеру, включающему виды *M. yokogawai*, *M. takahashii*, *M. miyatai* и *M. hakubaensis*. Минимальные генетические дистанции из перечисленных видов – между *M. suifunensis* и *M. yokogawai* (14%). Все указанные значения генетических дистанций между *M. suifunensis* и другими представителями рода по трем маркерам лежат в диапазоне межвидовых отличий (Pornruseetairatn et al., 2016). *Metagonimus suifunensis* отличается от *M. yokogawai* и по полноразмерным последовательностям участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (длина участка – 1134 п.н.): если внутри кластера, объединяющего образцы *M. suifunensis*, последовательности практически не отличаются друг от друга (0,3% отличий), то от последовательности *M. yokogawai* (KJ631740, без подтверждающей публикации), исследуемый вид отличается на 1,85%. Ещё один критерий, который отделяет *M. suifunensis* от ближайшего по митохондриальному маркеру вида, *M. yokogawai*, – это разные стоп-кодоны у генов *cox1* (TAG vs TAA), *cytb* (TAA vs TAG) и *nad1* мтДНК (TAG vs TAA).

Что касается *M. pusillus*, то половозрелые особи данного вида по морфологии и метрическим показателям, за исключением незначительных различий в размерах семенников и яичника, идентичны сосальщику *M. katsuradai*, ранее идентифицированному на юге Дальнего Востока (таблица 7, Беспрозванных, 1987). Исходя из морфометрических показателей, считаем, что они принадлежат одному виду.

Metagonimus pusillus значительно отличается по размерам тела, присосок, глотки и других параметров от других мелких представителей рода (размер тела менее 0,650 мм) – *M. hakubaensis* и *M. minutes* (таблица 7). По морфологическим критериям, используемым для дифференциации видов этого рода (соотношение присосок, положение правого семенника, матки и

желточников; Pornruseetairatn et al., 2016), *M. pusillus*, *M. katsuradai* и *M. otsurui* не имеют различий. При этом, черви в нашем материале отличаются от *M. otsurui* по соотношению частей семенного пузырька: передняя часть семенного пузырька у *M. otsurui* крупнее, чем задняя, а у *M. pusillus* передняя часть имеет меньшие размеры (Shimazu, 2002). Также эти виды имеют отличия в максимальных размерах большинства органов (таблица 7). От особей *M. katsuradai* полученные нами черви отличаются длиной глотки, максимальными размерами семенников и яичника (Shimazu, 2003) и максимальной шириной тела (Izumi, 1935, цит. по Ito, 1964b). Принадлежность дальневосточных червей *M. pusillus*, *M. katsuradai* и *M. otsurui* разным видам подкрепляется и имеющимися между ними морфометрическими различиями на стадии церкарии (таблица 8). Церкарии первых отличаются от церкарий *M. katsuradai* меньшими размерами тела, ротовой присоски и хвоста, а также количеством рядов крючков и количеством крючков в каждом ряду. Меньше различий обнаружено между церкариями *M. pusillus* и *M. otsurui*: они отличаются длиной фаринкса (таблица 8).

Таблица 8 – Размеры церкарий *M. pusillus* и морфометрически близких видов *Metagonimus* (в мм)

Признак	<i>M. pusillus</i> (= <i>M. katsuradai</i>) (Беспрозванных и др., 1987)	<i>M. katsuradai</i> (Ito, 1964a)	<i>M. otsurui</i> (Shimazu, Urabe, 2002)
Тело, Д	0,150-0,190	0,266-0,336	0,188-0,210
Тело, Ш	0,067-0,083	0,112-0,133	0,066-0,074
Ротовая присоска, Д	0,028-0,031	0,040-0,046	0,038-0,044
Ротовая присоска, Ш	0,022-0,028	0,032-0,038	0,026-0,028
Фаринкс, Д	–	–	0,010-0,012
Фаринкс, Ш	–	–	0,012-0,014
Брюшная присоска, Д	–	0,017-0,024	0,014-0,020
Брюшная присоска, Ш	–	0,017-0,024	0,014-0,020
Хвост, Д	0,300-0,350	0,420-0,490	0,350-0,390
Хвост, Ш	0,030-0,035	0,034-0,042	0,023-0,031
Крючья	29: 4+5+16+4 (1-4 ряд)	6+12 (иногда 23)+15-16 (1-3 ряд)	4 в первом ряду

Д– длина, Ш – ширина.

Таким образом, совокупность всех морфометрических и морфологических показателей свидетельствует о принадлежности дальневосточных червей в настоящем исследовании новому виду, которому дано название *M. pusillus*.

Отличия *M. pusillus* на морфологическом уровне подтверждаются и молекулярно-генетическими данными. На реконструкциях филогенетических связей внутри рода *Metagonimus* по гену 28S рРНК, участку ITS2 рДНК и гену *cox1* мтДНК, *M. pusillus* формирует отдельные ветви с высокой бутстреп-поддержкой/апостериорной вероятностью (рисунки 9-11). На дереве, построенном с использованием первого маркера, *Metagonimus pusillus* формирует внешнюю ветвь по отношению к видам из Японии – *M. katuradai*, *M. otsurui* и неидентифицированному до вида представителю рода *Metagonimus* (*Metagonimus* sp. 3). От всех перечисленных видов *M. pusillus* отличается на 0,6-0,7%. На реконструкции по участку ITS2 рДНК образцы *M. pusillus* образовали общий кластер с *M. otsurui* и *M. katuradai*, от которых дальневосточные черви отличаются на 0,5 и 1,6% соответственно. По данным митохондриального маркера *M. pusillus* наиболее близок к виду *M. katuradai*: на филогенетической реконструкции они образуют общий кластер, а дистанции между ними составляют 9,5%. Совокупность данных по использованным маркерам и, в частности, генетическим дистанциям между *M. pusillus* и другими представителями рода, которые превышают значения отличий между всеми представителями рода, включая наиболее близкие японские виды *M. otsurui* и *M. katuradai*, подтверждают валидность *M. pusillus*.

Таким образом, исходя из комплексных данных, включающих отличия по морфологическим и молекулярно-генетическим критериям, оба представителя рода в настоящем исследовании можно считать самостоятельными видами, обозначенными как *M. suifunensis* и *M. pusillus*. После опубликования данных по этим двум видам (Shumenko et al., 2017;

Tatonova et al., 2018) в Японии были описаны ещё 4 вида рода *Metagonimus*: *M. kogai*, *M. saitoi*, *M. shimazui* и *M. kinoi* (Nakao et al., 2022). Однако авторы подчеркивают, что новые виды имеют существенные отличия от видов, описанных на территории юга Дальнего Востока России, как по морфологическим критериям, так и согласно молекулярным данным. Более того, авторы не обнаружили *M. suifunensis* и *M. pusillus* на территории Японии, то есть виды на юге ДВ России являются эндемичными. В августе 2023 г. были впервые опубликованы молекулярно-генетические данные для представителя рода *Metagonimus* из Европы (Cech et al., 2023). Несмотря на то, что паразиту не присвоено название, авторы отмечают, что вид хорошо дифференцируется не только от вида *M. yokogawai*, но и от всех азиатских видов.

3.3. Филогенетические отношения внутри рода *Metagonimus*

Как упоминалось выше, виды рода *Metagonimus* подразделяются по размерам тела. Реконструкция филогенетических связей внутри рода на основе последовательностей гена 28S рРНК также показывает разделение на две группы: имеющих более крупные размеры тела, и видов более мелкого размера (рисунок 9). Все узлы на построенном дереве имеют высокую статистическую поддержку (> 70%), за исключением ветви, сформированной *M. katuradai* (56%). Отдельные ветви объединили идентичные последовательности, относящиеся к девяти отдельным видам. Поскольку не идентифицированные до вида последовательности *Metagonimus* sp. 1 (LC375946, LC599529, LC599530) и *Metagonimus* sp. 1 (LC599531) не отличаются от *M. miyatai* и *M. takahashii* соответственно, то их можно отнести к указанным видам. Дистанции между видами рода *Metagonimus* по маркеру 28S варьируют в диапазоне от 0,1 (*M. katuradai* – *M. otsurui*) до 1,9 (*M. takahashii* – *M. otsurui*) (таблица 9).

Не идентифицированные до вида последовательности *Metagonimus* sp. 3 (LC422950, LC599533, LC599534) по генетическим дистанциям ближе к видам *M. katsuradai* и *M. otsurui*, с которыми формируют общий кластер на дереве (рисунок 9). Но поскольку дистанции между *Metagonimus* sp. 3 и этими двумя видами, выше, чем между *M. katsuradai* и *M. otsurui*, существует вероятность, что данная последовательность является валидным видом.

Таблица 9 – Генетические дистанции (ниже диагонали) между видами рода

Metagonimus по данным гена 28S рРНК

(значения стандартных ошибок указаны вверху диагонали)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>M. suifunensis</i>		0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003
2. <i>M. yokogawai</i>	0,008		0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004
3. <i>M. takahashii</i>	0,013	0,011		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
4. <i>M. hakubaensis</i>	0,010	0,011	0,015		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5. <i>M. miyatai</i>	0,007	0,011	0,014	0,011		0,003	0,004	0,003	0,003
6. <i>M. katsuradai</i>	0,011	0,014	0,018	0,011	0,013		0,001	0,002	0,001
7. <i>M. otsurui</i>	0,011	0,015	0,019	0,011	0,014	0,001		0,002	0,002
8. <i>M. pusillus</i>	0,011	0,012	0,016	0,009	0,011	0,006	0,007		0,002
9. <i>Metagonimus</i> sp. 3	0,011	0,014	0,018	0,009	0,011	0,002	0,003	0,006	

Группы, согласующиеся с данными по размеру паразитов, не выявлены с использованием второго ядерного маркера – участка ITS2 рДНК (рисунок 10). Часть узлов на дереве, построенном на основе последовательностей данного участка рибосомального кластера, имеют низкие значения поддержки. Отсутствие разделения представителей рода *Metagonimus* по участку ITS2 рДНК на две группы, с более крупным и более мелким размером тела, а также неразрешенная топология отдельных кластеров, могут быть связаны с тем, что данный маркер имеет недостаточное количество информативных сайтов (длина выровненного фрагмента составила всего 281 п.н.) и, как отмечалось ранее Тэнкхам с соавторами (Thaenkham et al., 2011), не подходит для филогенетического анализа надсемейства Opisthorchioidea

на уровне семейств. Несмотря на это, видовой уровень отличий хорошо определяется с использованием нуклеотидных последовательностей участка ITS2 рДНК. Как и в случае с геном 28S рРНК, большинство ветвей на дереве включают идентичные последовательности, принадлежащие одному из видов: *M. suifunensis*, *M. pusillus*, *M. takahashii*, *M. miyatai*, *M. hakubaensis*, *M. katsuradai* (рисунок 10). При этом, образцы из Китая, Кореи и Японии, обозначенные как *M. yokogawai*, разделились на три кластера (отмечены на рисунке 10 как Кластеры 1, 2 и 3). Генетические дистанции между ними (0,9-3,3%, таблица 10) находятся в диапазоне внутривидовых различий для *Metagonimus* (Pornruseetairatn et al., 2016) и класса Trematoda в целом (Vilas et al., 2005). То есть черви, обозначенные как *M. yokogawai* и вошедшие в указанные выше кластеры, могут относиться к разным видам, поскольку минимальное значение дистанций между видами рода *Metagonimus* по участку ITS2 рДНК равно 0,8% (таблица 10), а дистанции внутри кластеров 1 и 2 не превышают 0,2%, что говорит об относительной однородности образцов в обоих кластерах.

Таблица 10 – Генетические дистанции (ниже диагонали) между видами рода

Metagonimus по данным участка ITS2 рДНК

(значения стандартных ошибок указаны сверху диагонали)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>M. suifunensis</i>		0,009	0,010	0,010	0,010	0,010	0,013	0,007	0,011	0,012
2. <i>M. yokogawai</i> *	0,023		0,005	0,009	0,010	0,011	0,013	0,010	0,012	0,012
3. <i>M. yokogawai</i> **	0,031	0,009		0,010	0,011	0,012	0,014	0,011	0,013	0,013
4. <i>M. yokogawai</i> ***	0,028	0,025	0,033		0,006	0,010	0,014	0,011	0,013	0,013
5. <i>M. takahashii</i>	0,029	0,029	0,036	0,011		0,010	0,014	0,011	0,013	0,013
6. <i>M. miyatai</i>	0,030	0,035	0,042	0,032	0,032		0,012	0,009	0,011	0,012
7. <i>M. katsuradai</i>	0,042	0,049	0,057	0,055	0,055	0,039		0,013	0,005	0,007
8. <i>M. hakubaensis</i>	0,012	0,027	0,036	0,032	0,033	0,026	0,046		0,012	0,012
9. <i>M. otsurui</i>	0,035	0,041	0,049	0,048	0,047	0,032	0,008	0,038		0,005
10. <i>M. pusillus</i>	0,039	0,041	0,049	0,048	0,051	0,040	0,015	0,042	0,008	

*, **, *** – *Metagonimus yokogawai* из Кластеров 1, 2 и 3 соответственно.

Также *Metagonimus* sp. 4 (LC422948) может быть самостоятельным видом, так как отличается от *M. yokogawai* из кластера 3 на 0,5%. Однако без привлечения дополнительных данных, включающих морфологические критерии и дополнительные молекулярные маркеры, уточнить статус этих трематод на данный момент невозможно.

На дереве по участку ITS2 рДНК представлены и другие последовательности, чей таксономический статус требует уточнения. Так ещё один образец *M. yokogawai* (AB470525) объединился с тремя последовательностями *M. takahashii* и не отличается от двух из них, что указывает на принадлежность этого образца к *M. takahashii*. *Metagonimus* sp. 6 (LC422951) также не отличается от *M. katuradai* и может быть отнесен к данному виду. А неидентифицированный до вида *Metagonimus* sp. 5 (LC375947) кластеризуется с *M. miyatai*, и, несмотря на то, что они отличаются на 0,2%, этот образец также можно отнести к указанному виду.

В отличие от гена 28S рРНК, по данным гена *cox1* мтДНК, как и в случае с последовательностями участка ITS2 рДНК, виды не разделяются на кластеры по размерам тела (рисунок 11): *M. hakubaensis* объединился с более крупными образцами, хотя имеет размеры тела менее 0,650 мм, а крупный *M. miyatai* вошел в группу с мелкими метагонимусами. Положение *M. suifunensis* на дереве также не является достоверным, поскольку узел, объединяющий его с другими трематодами, имеет низкую поддержку. Вероятно, использование этого маркера для выявления отношений между надвидовыми таксонами разного ранга затруднено в результате того, что накопление замен в белок-кодирующей последовательности происходит неравномерно. Более того, на результат могло оказать влияние основное свойство митохондриальной ДНК – наследование по материнской линии. Большинство видов трематод являются гермафродитами, и, к сожалению, достоверно неизвестно, какое количество особей в отдельных таксонах передает митохондриальную ДНК по наследству, что может существенно

влиять на скорость накопления мутаций и, соответственно, затруднять интерпретацию филогенетических отношений на уровне выше вида, поскольку одни виды будут быстрее дивергировать, а другие – отличаться незначительно.

Тем не менее, данный маркер, как и участок ITS2 рДНК, достоверно дифференцирует виды рода *Metagonimus*: дистанции внутри видов рода *Metagonimus*: по данным частичной последовательности *cox1* варьировали от 0 до 0,4%, тогда как дистанции между видами существенно отличались и составляли от 9,5 до 18,3 % (таблица 11). Широкий диапазон межвидовых отличий, как упоминалось выше, может быть связан с особенностями наследования митохондриальных последовательностей и с различиями в скорости накопления мутаций.

Таблица 11 – Генетические дистанции (снизу диагонали) между видами рода *Metagonimus* на основе частичных последовательностей гена *cox1* мтДНК (значения стандартных ошибок указаны сверху диагонали)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>M. pusillus</i>		0,016	0,016	0,017	0,018	0,018	0,019	0,019
2. <i>M. katsuradai</i>	0,095		0,017	0,018	0,018	0,017	0,019	0,019
3. <i>M. otsurui</i>	0,105	0,112		0,017	0,017	0,019	0,020	0,018
4. <i>M. miyatai</i>	0,132	0,147	0,125		0,018	0,017	0,019	0,018
5. <i>M. suifunensis</i>	0,152	0,167	0,148	0,169		0,016	0,018	0,018
6. <i>M. yokogawai</i>	0,153	0,147	0,161	0,130	0,143		0,017	0,017
7. <i>M. takahashii</i>	0,157	0,175	0,183	0,165	0,162	0,136		0,017
8. <i>M. hakubaensis</i>	0,169	0,166	0,158	0,164	0,170	0,143	0,147	

Тем не менее, следует отметить, что при использовании генетических маркеров без применения морфологических критериев могут возникнуть проблемы при выделении видов. Так, например, существует вероятность ошибочной идентификации *M. otsurui* и *M. katsuradai* из Японии как отдельных видов. Ошибка в определении видового статуса *M. otsurui* и *M. katsuradai* могла возникнуть из-за выделения видов на промежуточной

стадии паразита (метацеркарии) (Pornruseetairatn et al., 2016). Это предположение подтверждают и низкие значения генетических расстояний, полученные этими авторами с использованием ядерных маркеров. И если участок ITS2 рДНК иногда показывает низкий уровень дивергенции между близкородственными видами трематод (Vilas et al., 2005) и мог не выявить отличия и между представителями рода *Metagonimus*, то ген 28S рРНК имеет более высокую степень достоверности при выявлении межвидовых отличий между представителями надсемейства Opisthorchioidea (Taenkham et al., 2011), то есть этот маркер должен был разделить виды *M. otsurui* и *M. katuradai*. Однако дистанции между *M. otsurui* и *M. katuradai*, полученные с помощью гена 28S рРНК в работе Порнруситайратна с соавторами (Pornruseetairatnet et al., 2016), оказались в 3–9 раз ниже значений для других представителей *Metagonimus*. В том числе, эта величина была в три раза меньше, чем значение генетических дистанций между обоими этими видами и *M. pusillus*. С другой стороны, в 2022 году Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) также использовали нуклеотидные последовательности гена 28S рРНК для построения филогенетических отношений внутри рода *Metagonimus*. В этой работе было описано четыре новых вида метагонимусов, циркулирующих на территории Японии. И если два из четырех новых видов (*M. saitoi* и *M. shimazui*), описанных авторами, значительно отличались от всех представителей рода по гену 28S рРНК, то *M. kinoi* был идентичен *M. katuradai*, а *M. kogai* – *M. takahashii* (Nakao et al., 2022). Таким образом, этот маркер, по-видимому, не подходит для дифференциации криптических видов *Metagonimus*.

Использованный в настоящей работе митохондриальный маркер (ген *cox1* мтДНК) оказался более эффективным для выделения криптических видов, описанных в работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022). Как упоминалось выше, последовательности гена 28S рРНК не дифференцировали два криптических вида (*M. kinoi* и *M. kogai*) от других

представителей рода (*M. takahashii* и *M. katsuradai* соответственно). Однако генетические дистанции по гену *cox1* мтДНК между *M. takahashii* и *M. kogai* составили 6,8%, а между *M. kinoi* и *M. katsuradai* – 8,1%, тогда как дистанции внутри всех видов *Metagonimus* не превышали 0,7% (Nakao et al., 2022). Таким образом, авторы уточнили для митохондриального маркера нижнюю границу межвидовых отличий внутри исследуемого рода и обозначили её как 6,8%, тогда как в нашей работе минимальное значение составило 9,5% (таблица 11). Исходя из данных полученных Накао с соавторами (Nakao et al., 2022), генетические отличия между *M. otsurui* и *M. katsuradai* из Японии по митохондриальному маркеру соответствуют межвидовому уровню (Pornruseetairatn et al., 2016).

Что касается разделения червей внутри рода *Metagonimus*, то, несмотря на расширение видового состава в работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022), ген *cox1* мтДНК, как в настоящем исследовании, не смог дифференцировать группы паразитов по размеру тела (Nakao et al., 2022). На дереве по ядерному маркеру, как и в настоящем исследовании, образовались два кластера, разделяющих крупных и мелких червей. Несмотря на то, что узлы на дереве Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) имели более низкую статистическую поддержку, данные в указанной статье не противоречат выделенным нами группам: *M. kogai* и *M. saitoi* вошли в группу крупных метагонимусов, а *M. shimazui* и *M. kinoi* объединились с более мелкими червями.

Таким образом, молекулярные данные для червей из рода *Metagonimus*, полученных нами в результате экспериментальных исследований показали, что разные маркеры можно использовать для разных целей. Данные по гену 28S рРНК согласуются с морфологическими данными, разделяющими все виды рода *Metagonimus* на две группы, что упрощает использование диагностических ключей для трематод с разными размерами тела. Два других маркера не подтверждают выявленное разделение на две группы по разным

причинам, однако они предоставляют дополнительные данные для разделения видов, что особенно важно в случае проблемы разделения криптических видов, не имеющих отличия по высококонсервативным ядерным маркерам (например, генам 18S и 28S рРНК).

3.4. Ареалы представителей рода *Metagonimus* на континентальной части Восточной Азии

Большинство описанных на данный момент видов рода *Metagonimus* (12 из 14) циркулируют на территории Японии и не зарегистрированы в континентальной части Восточной Азии. На континентальной части этого региона с использованием молекулярно-генетического анализа выявлены виды *M. yokogawai*, *M. suifunensis* и *M. pusillus* (Shumenko et al., 2017; Tatonova et al., 2018). Последний обнаружен в единственном локалитете. Все остальные представители рода зарегистрированы только на островах Японии (Nakao et al., 2022). На данный момент, перекрытие ареалов *M. yokogawai* и *M. suifunensis*, циркулирующих на континентальной части Восточной Азии, не обнаружено. Согласно генетическим данным, *Metagonimus* из Кореи (KC330755) идентичен частичным последовательностям гена *cox1* мтДНК *M. yokogawai* из Японии, то есть этот вид распространен в Корее и Японии. *Metagonimus suifunensis* в данный момент обнаружен только на юге ДВ России, на территории которой пока не подтверждено наличие *M. yokogawai*. Поскольку представители рода практически не изучены на территории Китая, достоверно неизвестно, где проходит континентальная граница между указанными видами. Тем не менее, для двух образцов из Китая (KX857497, KX832895, Qiu et al., 2017) местом сбора указаны реки провинции Хэйлунцзян, то есть не исключено, что ареалы двух видов пересекаются. Исходя из значений генетических отличий между *M. yokogawai* и *M. suifunensis* по полноразмерным последовательностям гена *cox1* мтДНК,

выявленных в настоящем исследовании, эти виды разошлись в позднем миоцене (примерно 6 млн. лет тому назад, если учитывать скорость накопления мутаций 2,5% на 1 млн. лет, Attwood et al., 2008). В этот период произошло понижение уровня Японского моря, а также поднятие отдельных участков земной коры, что привело к объединению Сахалина и Хоккайдо с материком на севере (Матюшков и др., 2014). В это же время образовался палео-Амур, дельта которого приблизилась к северной части Сахалина. Вероятно, существовал обмен малакофауной (и их паразитами) между Японией (Хоккайдо), Сахалином и Дальним Востоком России. Позднее в результате Япономорской трансгрессии в плиоцене значительная часть Сахалина была затоплена (Богатов и др., 2006), и обмен фаунами стал невозможным. Позже, в последний климатический минимум позднего плейстоцена (позднечюрмский этап, 18-20 тыс. лет назад), снова возник сухопутный мост, соединяющий Хоккайдо, Сахалин и материк, а уровень Японского моря был примерно на 110-130 метров ниже современного уровня (Короткий и др., 1996; Богатов и др., 2006). На юге остров Кюсю (Япония) и Корейский полуостров разделил только узкий пролив (примерно 10 км в ширину и 12 м в глубину). Воды полузамкнутого Японского моря, ограниченного сушей, были опреснены, когда он был почти полностью отделен от океана. Опреснение Японского моря во время последнего ледникового максимума (24-18 тыс. лет назад) было вызвано тем, что в него через Корейский пролив поступали прибрежные воды Восточно-Китайского моря, снижение солености которого, в свою очередь, обусловлено сбросом воды из рек Желтая и Янцзы. Также активный сброс воды в этот период происходил из бассейна реки Амур, который повлиял на увеличение запасов пресной воды в Японском море (Lee et al., 2008). Все перечисленные выше условия (опреснение и объединение Хоккайдо и Сахалина) обеспечивали свободный обмен элементов фауны, включая пресноводных обитателей, участвующих в циркуляции. Тем не менее, континентальная популяция

M. suifunensis, по-видимому, была изолирована на юге Дальнего Востока России, так как, помимо падения уровня моря, поздний плейстоцен характеризовался наличием ледникового периода (Короткий и др., 1996; Lee et al., 2008). В связи с этим, первый промежуточный хозяин *Metagonimus* не мог распространиться в более северные и холодные части палео-Амура. Этот вывод сделан на основе того факта, что современные моллюски семейства Semisulcospiridae также не распространяются в бассейне Амура выше 52-й параллели северной широты из-за низких температур (Посохов, 2004). Разрыв сухопутных связей территорий Японии и континентального Дальнего Востока России привел к ограничению генетического обмена между субпопуляциями *Metagonimus* из этих регионов. Вследствие независимой эволюции образовались два морфологически сходных вида, *M. suifunensis* и *M. yokogawai*. В то же время миграция *M. yokogawai* между южными Японскими островами и Корейским полуостровом была легко осуществима во время регресса в позднем плейстоцене. Относительно недавний распад сухопутных связей между Японией и Кореей обеспечили сохранение общих черт морфогенеза *M. yokogawai* на этих территориях. Что касается дальнейшего расселения *M. suifunensis*, то с большой долей вероятности, проникновение паразита на территорию ДВ России происходило через бассейн реки Амур в южные районы региона, бассейны реки Уссури, озеро Ханка и реки Раздольная. Об этом свидетельствуют данные, полученные при молекулярных исследованиях *M. suifunensis* из различных локалитетов юга ДВ России.

3.5. Современная структура популяции *Metagonimus suifunensis* и ее формирование

Микроэволюционные изменения популяций трематод, проанализированные на основе молекулярно-генетических методов,

позволяют судить о влиянии геологических и климатических изменений, а также разных хозяев на внутривидовые процессы на протяжении всей истории формирования паразитофауны отдельных регионов. Внутривидовая изменчивость, в свою очередь, является основой для образования таксонов более высокого ранга. До настоящего исследования для представителей надсемейства Opisthorchioidea на территории юга Дальнего Востока России генетическая структура популяции была изучена только для *C. sinensis* (Chelomina et al., 2014; Tatonova et al., 2017). *Metagonimus suifunensis* имеет общее эволюционное прошлое с китайской печеночной двуусткой. Оба вида циркулируют с участием пресноводных жаберных брюхоногих моллюсков и рыб в качестве первых и вторых промежуточных хозяев соответственно, а млекопитающие являются их окончательными хозяевами. Более того, на территории Северо-Восточной и Восточной Азии ареалы этих паразитов перекрываются. Всё перечисленное выше позволяет их считать идеальными модельными объектами для проведения сравнительного анализа структуры их популяций.

Оценка популяционной структуры *M. suifunensis* в настоящей работе проведена на основе нуклеотидных последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК. Полноразмерный участок ITS1-5.8S-ITS2 рДНК проанализирован для 64 образцов *M. suifunensis* из шести локалитетов Приморского края (р. Комаровка, р. Комиссаровка, р. Илистая, р. Одарка, р. Сорочевка и р. Арсеньевка, таблица 3). Установлено, что образцы *M. suifunensis* по данному маркеру практически не отличаются друг от друга. Как отмечалось выше (раздел 3.1), обнаружена только одна замена у одного образца в участке ITS1 рДНК и внутригеномный полиморфизм в участке ITS2 рДНК у двух других образцов. Все остальные последовательности участка ITS рДНК были идентичны. Для других представителей рода *Metagonimus* данные по внутривидовой изменчивости на основе этого участка рибосомального кластера отсутствуют.

В противоположность обнаруженному для *M. suifunensis* низкому уровню полиморфизма, популяция *C. sinensis* имеет более высокую изменчивость в участке ITS рДНК, включая наличие инделов (Tatonova et al., 2017). Для других трематод также выявлено наличие изменчивости этого маркера. Так, например, молекулярное исследование *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 (семейство Harpororidae) на юге Дальнего Востока России также показало вариабельность этого фрагмента рДНК: выявлено наличие трех генотипов в популяции этого вида (Besprozvannykh et al., 2015). Таким образом, уровень изменчивости участка рибосомального кластера индивидуален для представителей разных таксонов трематод. В случае с *M. suifunensis* проявляется его низкая внутрипопуляционная изменчивость. Также не исключено, что процессы гомогенизации, характерные для согласованной эволюции тандемно повторяющихся участков рибосомального кластера (van Herwerden et al., 1999), происходят более интенсивно в последовательностях транскрибируемых спейсеров рДНК *M. suifunensis*, чем для двух других видов на исследуемой территории, что могло повлиять на низкую изменчивость маркера для этого вида. В соответствии со сказанным выше, рибосомальные маркеры не эффективны при анализе популяционной структуры *M. suifunensis*.

Как показали исследования, особенности популяции *M. suifunensis* выявляются при использовании нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов. Для вида получена 81 полноразмерная последовательность гена *cox1* мтДНК, 87 полных последовательностей гена *cytb* мтДНК и 56 полных последовательностей гена *nad1* мтДНК. Для анализа объединенной последовательности митохондриальных генов и адекватному сравнению наборов данных по разным маркерам, количество последовательностей по всем трем митохондриальным генам (*cytb*, *nad1*, *cox1*) приведено к единому значению – 56 образцов (Таблица 4). Все данные ниже приведены для указанного размера выборки.

Анализ полной последовательности гена *cox1* мтДНК показал, что представленная в настоящем исследовании выборка *M. suifunensis* является панмиктической гомогенной популяцией. По данному маркеру существенных различий между выборками из разных локалитетов не обнаружено. Все параметры разнообразия для *M. suifunensis* были ниже, чем выявлено для *C. sinensis*, циркулирующего на той же территории (Tatonova et al., 2019). Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие имели следующие значения: $\pi = 0,0009 + 0,0002$; $Hd = 0,518 + 0,083$. Замены вдоль нуклеотидной последовательности гена *cox1* мтДНК распределены неравномерно для отдельных выборок (рисунок 12). В выборке из Еврейской автономной области есть два коротких консервативных участка в диапазоне 503-704 п.н. и 1243-1467 п.н., в последовательностях *M. suifunensis* из Хабаровского края консервативные участки обнаружены в диапазоне 275-680 п.н. и 1042-1525 п.н., а в выборке из Приморского края обнаружена консервативная область в диапазоне 162-783 п.н. Ранее для *C. sinensis* при анализе гена *cox1* мтДНК было выявлено увеличение размера фрагментов гена без мутаций в выборках паразита в направлении с севера на юг (Chelomina et al., 2014), тогда как для отдельных локалитетов *M. suifunensis* не обнаружено закономерностей в распределении консервативных участков в соответствии с географическим расположением выборок. Существует вероятность, что такая корреляция вообще отсутствует для *M. suifunensis*. С другой стороны, отсутствие закономерностей может быть связано с тем, что в настоящем исследовании паразит получен из выборок юга Дальнего Востока, которые распределены не только с юга на север (как в случае с *C. sinensis*), но и в западном и восточном направлениях, поэтому выявить связь с географическим распределением *M. suifunensis* гораздо сложнее.

В общей выборке *M. suifunensis* наибольшее количество последовательностей гена *cox1* мтДНК (25%) имеет синонимичную замену в позиции 762 п.н. (рисунок 12). В отдельных выборках из Приморского и

Хабаровского краев и Еврейской Автономной области эта мутация также представлена с высокой частотой. Но если в выборке из Приморского края только 8% особей имеют этот полиморфный сайт (частота других мутаций также составляет 8%), то у почти половины выборки (48%) из Еврейской Автономной области выявлен этот признак, тогда как частота остальных мутаций в этом локалитете не превышает 20%. Возможно, в популяции *M. suifunensis* идет отбор особей с этой заменой, однако значение мутации для паразита остается под вопросом.

Низкий уровень изменчивости *M. suifunensis* по гену *cox1* мтДНК сопровождается наличием простой звездообразной структуры MST, состоящей из анцестрального гаплотипа, а также периферических гаплотипов с низкой частотой встречаемости и малым количеством мутационных шагов (рисунок 13а). Всего выявлено 16 гаплотипов, большинство из которых отличаются от предкового на 1 мутационный шаг, три гаплотипа имеют отличия в 2-4 мутации. Также есть группа из шести гаплотипов, отличающихся от основного на 1-9 мутационных шагов.

График распределения попарных генетических различий для *M. suifunensis* по гену *cox1* мтДНК унимодален (рисунок 14а), что свидетельствует об экспансии паразита. Этот результат сочетается со значительным отрицательным значением теста Фу F_s , что также указывает на недавний рост численности популяции с небольшим эффективным размером (Fu, 1997; Excoffier, 1999, таблица 12). Кроме того, график имеет L-образную форму, а пик находится в диапазоне 0-1, что указывает на влияние эффекта «бутылочного горлышка» на популяцию паразита в недавнем прошлом. Эта гипотеза подтверждается показателем теста нейтральности Таджимы, которое имеет значительное отрицательное отклонение от нуля (Tajima, 1989, таблица 12).

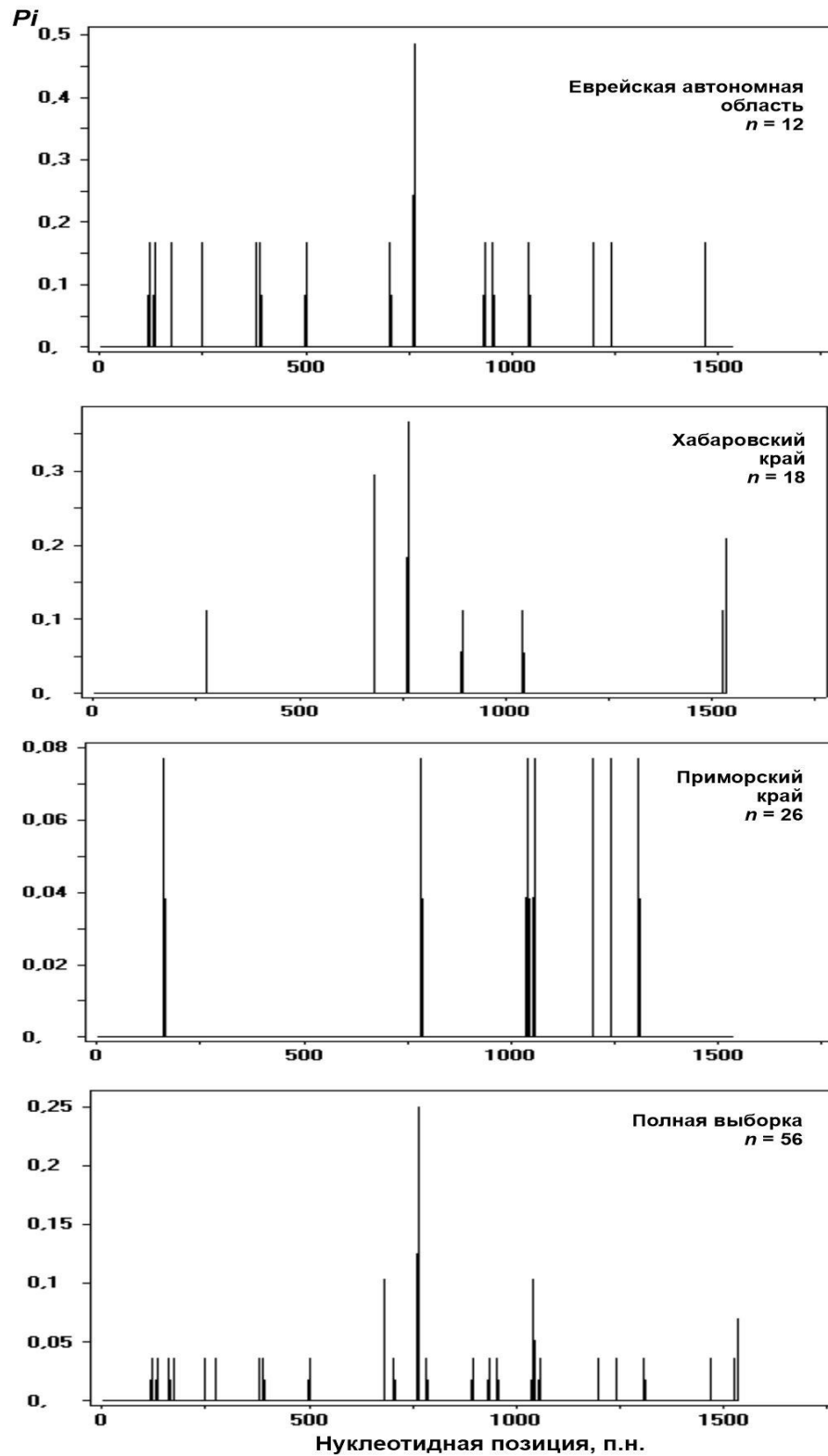


Рисунок 12 – Распределение нуклеотидных замен для полноразмерных последовательностей гена *cox1* мтДНК для субпопуляций *Metagonimus suifunensis* из разных регионов и полной выборки.

P_i – нуклеотидное разнообразие

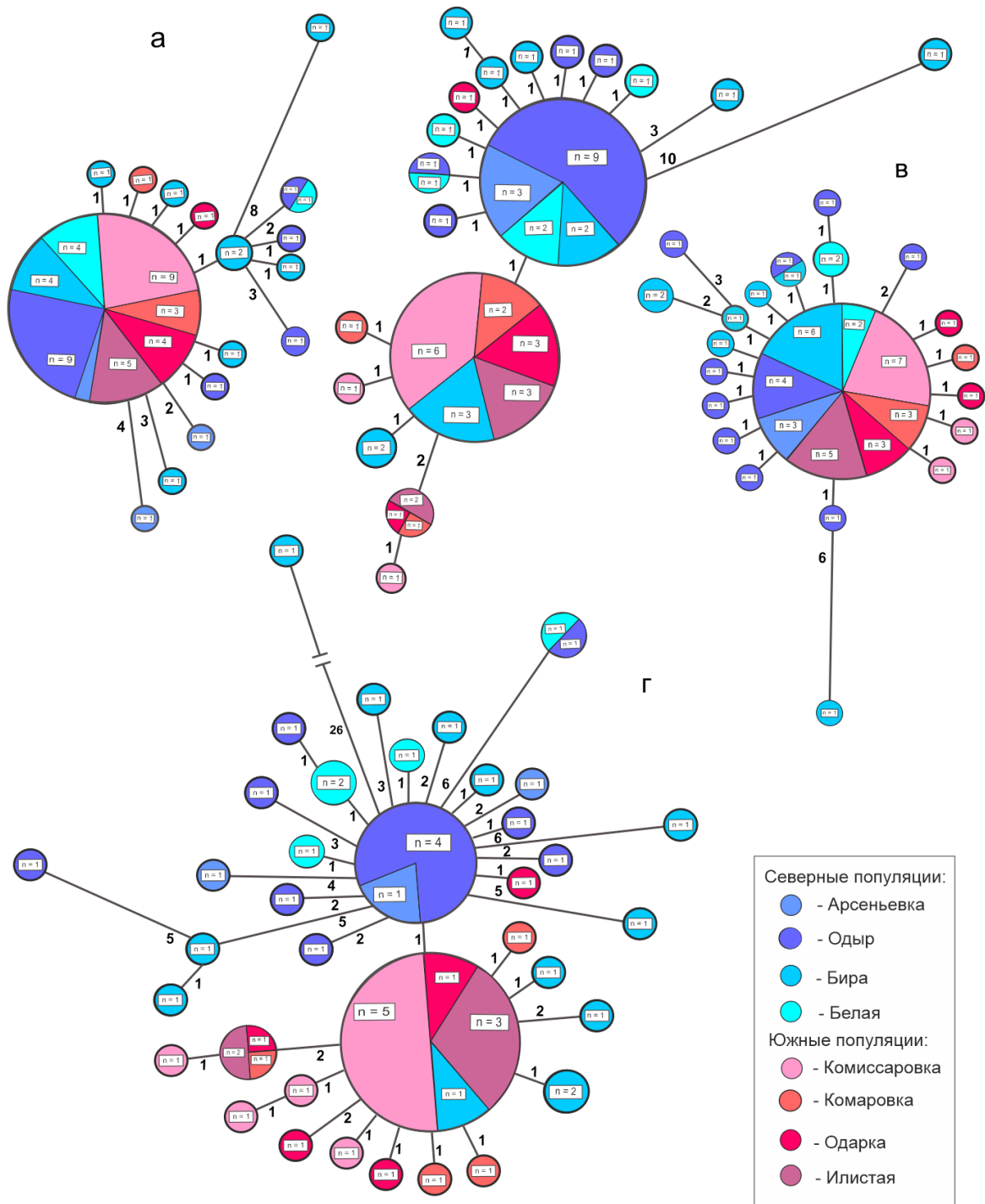


Рисунок 13 – Реконструкция MST для гаплотипов *Metagonimus suisfunensis* на основе последовательностей гена: а – *cox1*, б – *cytb*, в – *nad1*, г – комбинированного набора данных по трем митохондриальным маркерам. Числами обозначено количество нуклеотидных замен между последовательностями; *n* – количество образцов в гаплотипе

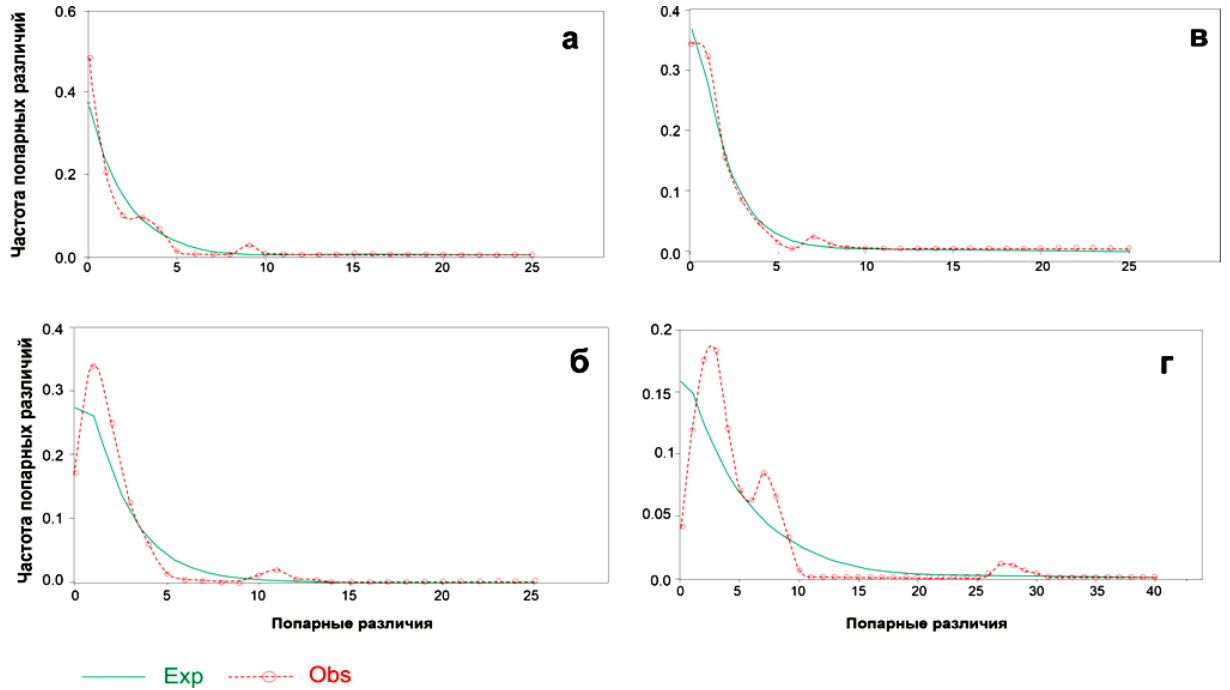


Рисунок 14 – Распределение попарных генетических отличий для последовательностей митохондриальных генов: а – *cox1*, б – *cytb*, в – *nad1*, г – комбинированного набора данных из трех маркеров

Таблица 12 – Статистика теста нейтральности и параметры демографической экспансии (и их *P*-уровни) для полной выборки *Metagonimus suifunensis*

Маркер	Критерий Таджимы <i>D</i>		Критерий теста Фу <i>F_s</i>		Статистические критерии			
	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>	<i>SSD</i>	<i>P</i>	<i>HRI</i>	<i>P</i>
<i>nad1</i>	-2,471	0,000	-28,163	0,000	0,003	0,790	0,038	0,910
<i>cytb</i>	-2,301	0,001	-27,277	0,000	0,002	0,640	0,059	0,370
<i>cox1</i>	-2,515	0,000	-28,167	0,000	0,334	0,000	0,094	1,000
<i>cytb+nad1+cox1</i>	-2,597	0,000	-25,637	0,000	0,005	0,500	0,018	0,560

SSD – сумма квадратных отклонений; *HRI* – индекс шероховатости.

Таким образом, данные по гену *cox1* мтДНК позволяют предположить, что в недавнем времени произошло резкое сокращение численности популяции *M. suifunensis* на юге Дальнего Востока России. Это снижение привело к уменьшению генетического разнообразия *M. suifunensis*, в отличие от популяции *C. sinensis*, которая, по-видимому, не была подвержена воздействию эффекта «бутылочного горлышка» (Chelomina et al., 2014).

Обнаруженный для *M. suifunensis* эффект «бутылочного горлышка» может иметь следующие причины. Во-первых, возможно, это связано с резким снижением численности одного из хозяев, поскольку изменения в генетической структуре популяции паразитов обычно коррелируют с эволюционными процессами в популяции хозяев (Rannala, 1992). *Metagonimus suifunensis* и *C. sinensis* циркулируют с участием одних и тех же вторых и окончательных хозяев, – это карповые рыбы и рыбаобразные млекопитающие соответственно. В противоположность этому, первые промежуточные хозяева этих трематод относятся к разным таксономическим группам моллюсков. Для *C. sinensis* это улитки семейства *Vithyniidae*, обитающие в стоячих водоемах (Посохов, 2004; Tang et al., 2016), а для *M. suifunensis* это моллюски из семейства *Semisulcospiridae*, обитающие в реках (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Из-за различий в экологии первых промежуточных хозяев этих паразитов, можно предположить, что существует связь между возможным снижением числа первых промежуточных хозяев и значительным сокращением популяции *M. suifunensis*. Однако в недавнем прошлом климатические условия на исследуемой территории были стабильными, так как позднеплейстоценового оледенения в Приморье не было (Короткий и др., 1996), что коррелирует с высоким уровнем генетической изменчивости, обнаруженным для *C. sinensis*, имеющего сходный жизненный цикл. Поэтому более вероятно, что не климатические причины оказали влияние на численность моллюсков и, косвенно, на уровень изменчивости *M. suifunensis*. Тем не менее, поскольку

представители семейств Bithyniidae и Semisulcospiridae занимают разные экологические ниши, численность этих групп моллюсков могла в разной степени зависеть от внешних факторов, поэтому полностью исключать эту гипотезу нельзя.

Второй возможной причиной низкой изменчивости популяции *M. suiifunensis* по сравнению с *C. sinensis* является потеря количества особей за счет особенностей локализации метацеркарий *M. suiifunensis* во втором промежуточном хозяине. Метацеркарии *C. sinensis* располагаются в мышечной ткани рыб и легко переносят зимние отрицательные температуры. В свою очередь, метацеркарии *Metagonimus* локализуются на чешуе и плавниках рыб и, как показали исследования (Беспрозванных, Ермоленко, 2005), не переносят зимний период. То есть каждый год происходит полное обновление метацеркарий. В соответствии с этим, накопление различных гаплотипов китайской печеночной двуустки в течение нескольких сезонов более вероятно, в то время как количество вариантов гаплотипов *M. suiifunensis* может быть ограничено в каждом отдельном локалитете в результате естественной убыли метацеркарий. То есть в этом случае популяция *M. suiifunensis* должна была сформировать уникальный набор гаплотипов в каждом локалитете в результате процессов изоляции. Однако, несмотря на то, что рыбы, естественно инфицированные метацеркариями *M. suiifunensis*, были пойманы в географически удаленных локалитетах, во всех выборках наблюдалось ограниченное количество сходных между собой гаплотипов. Это означает, что различия в локализации *C. sinensis* и *M. suiifunensis* в тканях рыб не влияет на изменчивость паразитов.

В то же время, положительный эффект на сохранение внутривидового разнообразия может оказывать влияние продолжительность жизни трематоды в окончательном хозяине. Так, например, взрослые черви *C. sinensis* локализуются в печени млекопитающих и могут сохраняться в течение длительного времени, если не на протяжении всей жизни хозяина,

тогда как *M. suifunensis* по результатам собственных исследований сохраняют жизнеспособность в кишечнике окончательного хозяина (в лабораторных условиях) в течение 23-26 суток. Таким образом, китайская печеночная двуустка в случае неблагоприятных климатических условий может сохранять генетическое разнообразие, в течение длительного времени находясь в теле хозяина, имеющего стабильную температуру и высокую продолжительность жизни. В любом случае, оценить влияние всех хозяев на уровень изменчивости *M. suifunensis* возможно только в условиях молекулярно-генетического анализа больших выборок паразита, полученного от естественно зараженных промежуточных и окончательных хозяев.

Ещё одна причина снижения генетической изменчивости может быть связана с «эффектом основателя». Небольшое количество паразита могло быть перенесено из ранее образовавшегося центра формирования вида, который мог быть не обнаружен в настоящем исследовании, или мог исчезнуть на настоящий момент в результате действия разных факторов, в том числе, позднеплейстоценового оледенения из-за локализации в более северных участках ДВ России.

К сожалению, данные по популяционной структуре других представителей рода *Metagonimus*, кроме *M. suifunensis*, на основе анализа полноразмерных последовательностей гена *cox1* мтДНК или других митохондриальных маркеров на настоящий момент нет. Однако в работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) для разных видов рода был использован более короткий фрагмент данного маркера (801 п.н.), то есть последовательности были в 2 раза короче анализируемых в настоящем исследовании. В указанной статье использовалась большая выборка изолятов, полученных с разных островов Японии, но, несмотря на это, для нового вида *M. saitoi*, также как и для *M. suifunensis*, выявлена простая звездообразная структура гаплотипической сети с незначительно отличающимися гаплотипами второго порядка. В противоположность этому,

гаплотипическая сеть, построенная на основе этого же маркера (ген *cox1* мтДНК) для паразита, обозначенного авторами как «комплекс видов *Metagonimus miyatai*» (Nakao et al., 2022), имела более сложную структуру, основные кластеры которой коррелировали с географическим распределением паразита, несмотря на то, что уровень нуклеотидной изменчивости внутри выборки был достаточно низким. Конечно, полученные авторами данные о внутривидовой подразделенности могли быть связаны с тем, что, как указано в статье, они работали с «комплексом видов», но, в действительности, обнаруженные отличия между гаплогруппами незначительны и не достигают межвидового уровня, то есть в работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) представлена популяционная структура внутри вида *Metagonimus miyatai*. Более того, между географическими изолятами этого вида на данный момент идет активный обмен мигрантами в направлении с востока на запад, поскольку в гаплогруппах, включающих преимущественно образцы из западных локалитетов также присутствуют образцы из восточных выборок (см. рисунок 7 в статье Nakao et al., 2022). Эти мигранты в значительной степени препятствуют изоляционным процессам. Таким образом, для *M. miyatai* из Японии частичные последовательности этого маркера оказались достаточно чувствительными для оценки микроэволюционных процессов, несмотря на то, что даже полноразмерные последовательности гена *cox1* мтДНК не смогли выявить популяционную структуру *M. suiifunensis* на территории юга ДВ России, также как и частичные последовательности этого гена оказались неэффективными при оценке изменчивости для японского вида *M. saitoi*.

Анализ гена *cytb* мтДНК для *M. suiifunensis* также показал низкую изменчивость, аналогично гену *cox1* мтДНК. Для полноразмерных последовательностей гена *cytb* мтДНК нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие имели следующие значения: $\pi = 0,0017 \pm 0,0005$, $Hd = 0,828 \pm 0,036$. Эти показатели нуклеотидной и гаплотипической изменчивости для

этого маркера в 1,8 и 1,6 раза выше, чем для гена *cox1* мтДНК. Как и для предыдущего маркера, график распределения попарных отличий имеет пик в диапазоне 1-2 (рисунок 14б), что подтверждает экспансию паразита и прохождение через «бутылочное горлышко» в недавнем прошлом.

Несмотря на низкое генетическое разнообразие, ген *cytb* мтДНК выявил две гаплогруппы, северную и южную, которые связаны с географическим распространением *M. suifunensis* на Дальнем Востоке России. Эти группы включают сходное количество образцов: в южную гаплогруппу вошло 27 последовательностей, сгруппированных в 6 гаплотипов, а северная гаплогруппа объединила 29 образцов и 13 гаплотипов (рисунок 13б). Каждая гаплогруппа имеет звездообразную структуру и помимо анцестрального гаплотипа включает гаплотипы следующего порядка, которые отличаются от анцестрального гаплотипа на 1-3 мутационных шага. Помимо этого, в состав южной гаплогруппы входит уникальная последовательность, отличающаяся от предкового гаплотипа этой гаплогруппы на 10 мутаций.

Географическая граница между образцами из северной и южной гаплогрупп проходит между бассейнами рек Арсеньевка и Сорочевка (рисунок 2). Стоит отметить, что на карте точка сбора промежуточных хозяев паразита на реке Арсеньевка расположена южнее рек Сорочевка и Одарка, но образцы *M. suifunensis* из этого локалитета вошли в состав северной гаплогруппы. Однако это не противоречит отнесению образцов из реки Арсеньевка к северным субпопуляциям, так как эта река впадает в реку Уссури, и фактически ее водное русло связано с бассейном Амура севернее реки Сунгач.

Большинство южных гаплотипов представлено образцами *M. suifunensis* из рек, впадающих в бассейн озера Ханка. В эту гаплогруппу также включены образцы из реки Комаровка, которая является притоком реки Раздольная (рисунок 2). Несмотря на то, что бассейн этой реки в

настоящее время не связан с озером Ханка, до среднего плейстоцена она также входила в состав палео-Амура и впадала в озеро Ханка (Белянина и др., 2009). По-видимому, предковый гаплотип южных гаплогрупп сформировался до переориентации потока реки Раздольная на юг. К сожалению, из-за низких показателей изменчивости невозможно сопоставить геологические процессы с молекулярными данными, которые могли бы более точно датировать время дивергенции северных и южных субпопуляций.

Единственным водотоком, соединяющим южную и северную субпопуляции, является довольно мелководная река Сунгач, через которую, вероятно, в обоих направлениях ограничена миграция промежуточных хозяев *M. suifunensis*. Изоляция северных и южных субпопуляций, которая сохраняется, несмотря на то, что окончательные хозяева паразита могут совершать более длительные миграции, вызвала формирование различий между гаплогруппами, а именно наличие фиксированной несинонимичной замены. Примечательно, что эта фиксированная транзиция (тимин, северная гаплогруппа ↔ цитозин, южная гаплогруппа) в положении 419 п. н. обнаружена рядом с редокс-центром цитохрома *b*, который находится в экстрамембранном домене белка. Причем выявленная замена локализуется на расстоянии одной аминокислоты от функционального центра, отвечающего за транспорт электронов. Последний входит в консервативную область, обнаруженную у различных животных, растений, грибов и бактерий (Howell, Gilbert, 1988; Howell, 1989). Такое расположение, близкое к функциональному центру, может свидетельствовать о наличии внутри популяции *M. suifunensis* отбора, направленного на сохранение двух аминокислотных вариантов (треонина, северная гаплогруппа ↔ метионин, южная гаплогруппа) в одинаковом соотношении, так как оба варианта, по-видимому, влияют на адаптационные способности паразита к различным климатическим условиям севера и юга Дальнего Востока России.

Сходный тип изоляции, связанный с первыми и вторыми промежуточными хозяевами выявлен и в выше упомянутой статье Накао с соавторами (Nakao et al., 2022), в которой для *Metagonimus miyatai* обнаружена не только географическая подразделенность внутри вида на западные и восточные группы, но и различия в перечне вторых промежуточных хозяев, участвующих в циркуляции паразита. Однако из работы не понятно, присутствуют ли оба набора вторых промежуточных хозяев-рыб в обеих географически разделенных субпопуляциях, или разделение видового состава хозяев связано с длительными изоляционными процессами и существованием водораздела между частями ареала. Последнее предположение нам представляется более реалистичным, поскольку многочисленные данные свидетельствуют о низкой специфичности метагонимуса ко вторым промежуточным хозяевам. Также авторы (Nakao et al., 2022) высказали гипотезу, что на популяционную структуру паразита существенное влияние оказывает первый промежуточный хозяин. Ранее для трематод было показано (Shalaby et al., 2010), что моллюски ограничивают набор генотипов паразитов за счет молекулярной адаптации к первому промежуточному хозяину. Более того, на территории Японии было выявлено (Miura et al., 2020), что представители рода *Semisulcospira*, являющиеся первыми промежуточными хозяевами видов рода *Metagonimus*, подразделяются на несколько клад, которые распределены в разных частях островов Японии, что совпадает распределением гаплогрупп *Metagonimus miyatai*. Как менее мобильные хозяева, моллюски могут ограничивать распространение паразитов в большей степени, чем более разнообразные и менее специфичные вторые промежуточные хозяева. Однако данный вопрос требует дополнительных исследований, в том числе, на континентальной части Восточной Азии, на которой циркулирует *M. suifunensis*.

Помимо выявленной изоляции между двумя гаплогруппами, в северных субпопуляциях *M. suifunensis* были обнаружены пять образцов,

принадлежащих к южной гаплогруппе и составляющих 19% от общего количества последовательностей в этой гаплогруппе. То есть миграция паразита в настоящее время происходит преимущественно в направлении с юга на север, что оказывает влияние на то, что последовательности гена *cytb* мтДНК из северной гаплогруппы *M. suifunensis* имеют более высокие значения изменчивости по сравнению с южной гаплогруппой, а количество гаплотипов – в два раза больше, чем в выборке, включающей образцы из южных субпопуляций (таблица 13).

Таблица 13 – Описательная статистика генетической изменчивости последовательностей гена *cytb* мтДНК для двух гаплогрупп и полной выборки *Metagonimus suifunensis*

Выборка	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	π	<i>Hd</i>
Северная гаплогруппа	29	13	23	0,0015 ± 0,0005	0,702 ± 0,096
Южная гаплогруппа	27	6	6	0,0009 ± 0,0002	0,590 ± 0,101
Полная выборка	56	19	30	0,0017 ± 0,0005	0,828 ± 0,036

n – количество последовательностей; *H* – количество гаплотипов; *S* – количество полиморфных сайтов; π – разнообразие нуклеотидов (\pm стандартная ошибка); *Hd* – разнообразие гаплотипов (\pm стандартная ошибка).

В противоположном направлении (с севера на юг) поток генов, по-видимому, менее интенсивен, так как в северной гаплогруппе был идентифицирован только один образец из южного локалитета (р. Одарка). Причины такого распределения гаплотипов внутри популяции сложно объяснить. С одной стороны, на формирование паттернов в пределах популяции *M. suifunensis*, возможно, оказывают влияние промежуточные и окончательные хозяева: первые обеспечивают изоляцию отдельных субпопуляций, тогда как вторые способствуют миграции паразитов в противоположные части ареала. С другой стороны, это может быть связано с

тем, что черви из южной гаплогруппы обладают высокой устойчивостью к различным биотическим и абиотическим условиям, что позволило им успешно существовать как на юге, так и на севере Дальнего Востока России. Например, консервативный участок на 5'-конце гена *cytb* мтДНК выявлен только для последовательностей из южных гаплотипов (рисунок 15), и не исключено, что это может быть не только следствием низкого уровня изменчивости в этих локалитетах, но отбором определенных признаков, влияющих на устойчивость паразита. Хотя вторая гипотеза менее вероятна, поскольку в южных частях ареала *M. suifunensis* более мягкие климатические условия.

Что касается третьего маркера, используемого в данной работе, для последовательностей гена *nad1* мтДНК уровень нуклеотидного разнообразия имеет низкое значение ($\pi = 0,0015 \pm 0,0004$) при высоком значении гаплотипического разнообразия ($Hd = 0,655 \pm 0,075$). Эти показатели изменчивости для этого маркера выше, чем у гена *cox1* мтДНК, но ниже, чем для гена *cytb* мтДНК. Распределение нуклеотидных замен по последовательности гена *nad1* равномерно (рисунок 15), а пик графика распределения попарных нуклеотидных замен находится в диапазоне 0-1 (рисунок 14в), как и для двух других митохондриальных маркеров.

Гаплотипическая сеть для гена *nad1* мтДНК имеет простую звездообразную структуру с одним предковым гаплотипом и 20 гаплотипами следующего уровня и не выявляет какого-либо разделения внутри популяции *M. suifunensis* (рисунок 13в). Большинство гаплотипов незначительно отличаются от основного (1-3 мутационных шага), но два из них отличаются на 4 и 7 мутации.

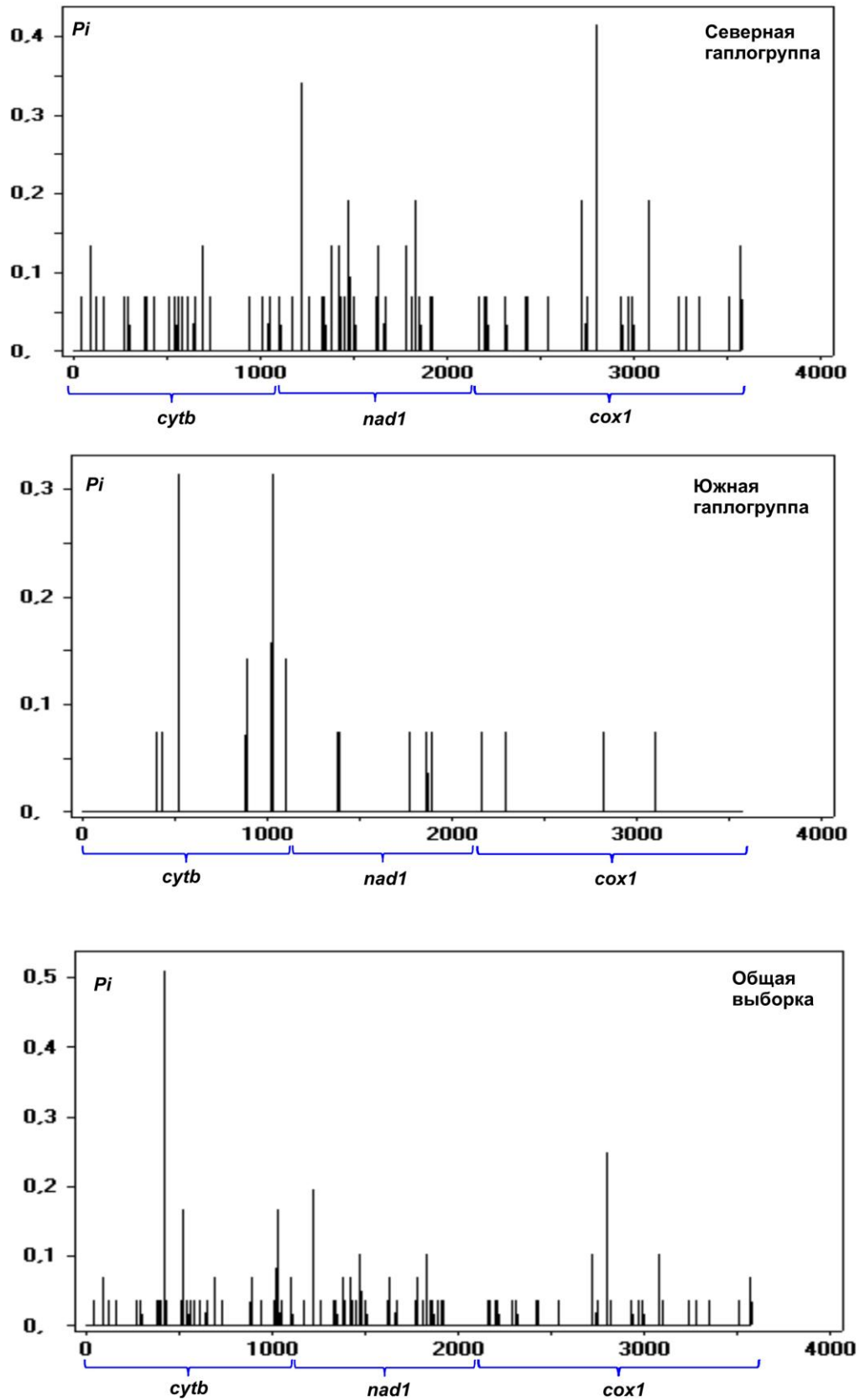


Рисунок 15 – Распределение нуклеотидных замен вдоль объединенной последовательности трех митохондриальных генов

Как упоминалось выше, подобная структура гаплотипической сети, обнаруженная для гена *nad1* мтДНК, была получена и на основе последовательностей гена *cox1* мтДНК (рисунок 13а). Гаплотипические сети по этим двум маркерам имеют и другие сходства. Так, например, большая часть последовательностей для генов *nad1* и *cox1* мтДНК была включена в анцестральный гаплотип (59 и 70% образцов соответственно). Также 10 гаплотипов следующего порядка, включающие 12 особей, совпали для обоих маркеров, то есть согласованные мутации у этих особей произошли одновременно в двух генах. Однако остальные гаплотипы второго и третьего порядка были уникальными: 10 для гена *nad1* и 5 для гена *cox1* мтДНК. Считается, что митохондриальная ДНК обычно наследуется как единый набор признаков (Hayashi, Iwata, 2013), поэтому то, что для обоих маркеров были обнаружены сходные гаплотипы, вполне объяснимо. Тем не менее, только 4 из 10 упомянутых выше общих гаплотипов для генов *cox1* и *nad1* мтДНК были идентифицированы при анализе данных по гену *cytb* мтДНК. Еще пять общих гаплотипов вошли в состав двух предковых гаплотипов северной и южной гаплогрупп, полученных для гена *cytb* мтДНК, а последний общий для генов *cox1* и *nad1* мтДНК гаплотип был разделен на два гаплотипа по гену *cytb* мтДНК, включивших по одной последовательность в каждом. То есть, несмотря на совместное наследование этих генов в митохондриальном геноме, накопление большинства мутаций внутри гена *cytb* мтДНК происходило независимо от двух других генов.

Для популяции *M. suifunensis* по данным комбинированных последовательностей, включающих все три митохондриальных гена (*cytb*, *nad1*, *cox1*), уровень нуклеотидного разнообразия составил $\pi = 0,0013 + 0,0002$, гаплотипического – $Hd = 0,958 + 0,017$. На гаплотипической сети MST все образцы паразита также разделились на северную и южную гаплогруппы, как и по данным гена *cytb* мтДНК (рисунок 13г). Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие выше для особей *M. suifunensis* из северной

Гаплотипы северной гаплогруппы (29 образцов, 23 гаплотипа) отличаются от предкового гаплотипа на 1-10 мутационных шагов, а один гаплотип отличается на 26 мутаций (рисунок 13г). Южная гаплогруппа включает сходную по размеру выборку из 27 образцов, но только 14 гаплотипов, большинство из которых отличаются от основного гаплотипа на меньшее количество мутационных шагов (1-3), чем гаплотипы северной группы.

В целом, все показатели изменчивости для северных субпопуляций выше, чем для южных ($\pi = 0,0017 + 0,0002$ vs. $0,0005 + 0,0001$, а $Hd = 0,975 + 0,018$ vs. $0,834 + 0,069$). Известно, что географический центр формирования вида чаще всего располагается на территории с оптимальными условиями существования и характеризуется наличием более высокого уровня генетической изменчивости, тогда как уменьшение числа вариантов аллелей является характерным показателем для вида на его периферии (Lesica, Allendorf, 1995; Bunnell, Campbell, 2004). В связи с этим, центр формирования популяции *M. suifunensis* находится в пределах территории, занимаемой особями из северных субпопуляций.

Совокупность данных по всем трем митохондриальным маркерам позволила выявить особенности популяционной структуры *M. suifunensis*, которые не определялись при анализе последовательностей отдельных генов. Так, например, на реконструкции MST предковый гаплотип северной гаплогруппы объединил 4 особи, полученные от метацеркарий из рыб реки Одыр (Большехехцирский заповедник), и одну из реки Арсеньевка, то есть уточнена область, которая является центром формирования северной гаплогруппы – это субпопуляция из реки Одыр. Из этого локалитета вид распространился в северном и южном направлениях (рисунок 17а).

Что касается южных частей ареала *M. suifunensis*, то, поскольку предковый гаплотип южной гаплогруппы включает образцы из трех южных локалитетов, точное географическое местонахождение центра образования

для южных субпопуляций неизвестно, однако, несомненно, он сформировался в бассейне озера Ханка.

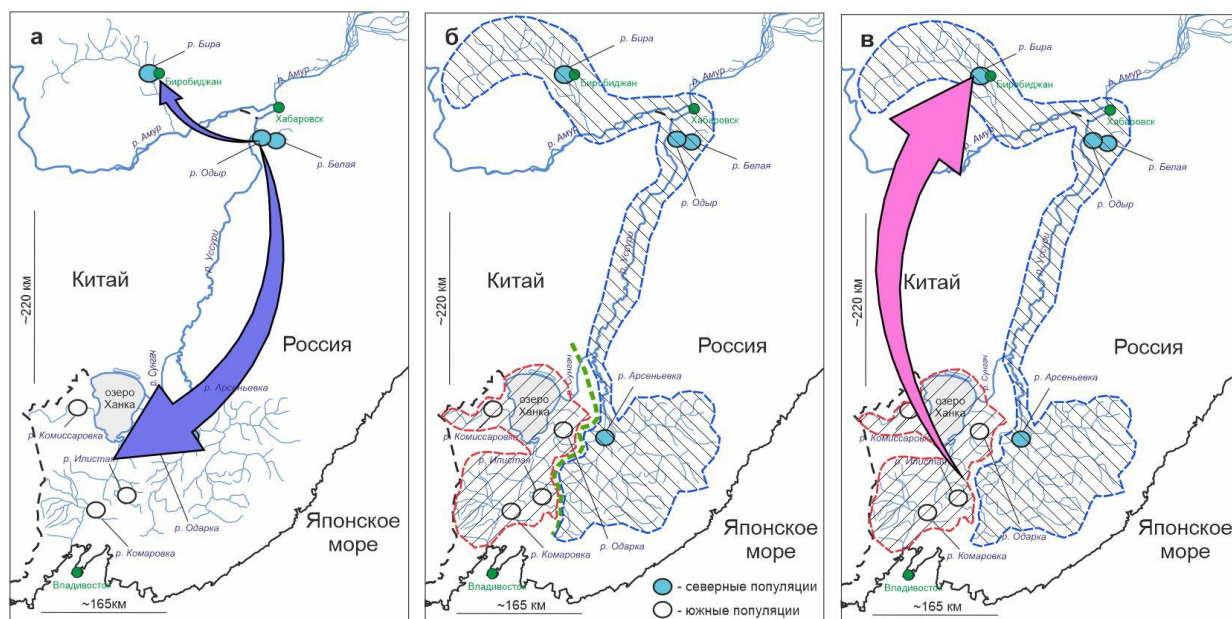


Рисунок 17 – Гипотетические эволюционные процессы в популяции *Metagonimus suifunensis*: а – распространение паразитов из центра, формирование северной гаплогруппы (река Одыр), б – изоляция между северными и южными субпопуляциями, в – миграция паразитов из южных локалитетов до реки Бира. Зеленой штриховой линией отмечен водораздел между северными и южными субпопуляциями

Примечательно, что образцы из реки Комаровка (бассейн реки Раздольная), в данный момент не впадающей в озеро Ханка, не включены в анцестральный гаплотип южной группы. С одной стороны, это может быть связано с ограниченным размером анализируемой выборки. С другой стороны, данные результаты могут быть следствием резкого снижения численности популяции *M. suifunensis* с последующим дрейфом генов в изолированной от бассейна озера Ханка субпопуляции из реки Раздольная.

Значение F_{st} между северными и южными субпопуляциями составляет 0,16 и является статистически значимым (5% уровень значимости), то есть

уровень F_{st} , полученный на основе сравнительного анализа образцов из северных и южных субпопуляций *M. suifunensis*, показал высокое значение дифференциации (большая дивергенция согласно Wright, 1978). Однако внутри этих субпопуляций значения F_{st} также составили 0,15 и 0,18 соответственно, что говорит о том, что они неоднородны, что, в том числе, связано с тем, что образцы из северных и южных субпопуляций вошли в обе гаплогруппы на MST (рисунок 13г). Об отсутствии полного обособления свидетельствует и значение потока генов (Nm , Slatkin, 1985) между субпопуляциями *M. suifunensis* в северной и южной частях изучаемого региона, которое составило 2,65 по данным комбинированной последовательности трех митохондриальных маркеров.

Предположительно, изоляция между южными и северными субпопуляциями возникла до среднего плейстоцена (рисунок 17б), когда произошла переориентация реки Раздольная в южном направлении (Беянина и др., 2009). Об этом косвенно свидетельствует тот факт, что, несмотря на наличие уникальных гаплотипов в выборке из реки Раздольная (р. Комаровка является ее притоком), в этой субпопуляции также присутствует гаплотип, идентичный образцам из других субпопуляций южной гаплогруппы, которые входят в бассейн озера Ханка (рисунок 13г). Не исключено, что этот паразит мог попасть в реку Раздольная с окончательными хозяевами, однако в этом случае обнаруженный в данной субпопуляции гаплотип трематоды более вероятно принадлежал бы предковому гаплотипу южной гаплогруппы, а другие образцы из субпопуляции реки Раздольная не отличались от образцов из других выборок южных субпопуляций или также входили в анцестральный гаплотип. Что касается обозначенного выше времени формирования изоляции внутри популяции *M. suifunensis*, то в среднем плейстоцене уже сформировалась палео-Ханка, размеры её постепенно изменялись, влияя на распространение паразита внутри этой водной системы. За последние 200 тысяч лет озеро

Ханка претерпело 4 периода регрессии, которые повлияли на температурные оптимумы в регионе (Zhu et al., 2011). Эти изменения коснулись и рек в пределах бассейна озера. В указанный период река Сунгач могла частично пересохнуть или обмелеть и изолировать первого и второго промежуточных хозяев, обитающих в разных частях бассейна реки Амур, что привело к обособлению субпопуляций *M. suifunensis*. Подтверждением предположения о влиянии промежуточных хозяев на структуру популяции *M. suifunensis* является изоляция, выявленная для другого представителя семейства Heterophyidae, *Haplorchis taichui* из Вьетнама, которая, согласно предположениям Дунга с соавторами (Dung et al, 2013), связана с существованием паразитов в разных речных бассейнах и невозможностью миграции промежуточных хозяев, особенно рыб. И, как упоминалось выше, сходный тип изоляции был обнаружен у другого представителя рода *Metagonimus* из Японии (Miura et al., 2020; Nakao et al., 2022).

По-видимому, после длительной изоляции, позволившей сформировать две гаплогруппы *M. suifunensis*, континентальная миграция возникла в северном направлении: от рек бассейна озера Ханка через Китай к субпопуляции из реки Бира (Еврейская автономная область) (рисунок 17в). Поток генов осуществлялся путем миграции окончательных хозяев, поскольку Бира не относится к южным локалитетам, но выборка из этой реки включает 42% южных гаплотипов. В других северных субпопуляциях (реки Одыр и Белая) гаплотипы из южных гаплогрупп также ранее были обнаружены в каждом из локалитетов, то только по одной особи из каждого локалитета (Tatonova and Shumenko, 2021, данные по 87 последовательностям гена *cytb* мтДНК, здесь не представлены). Направление миграции, а также ее однонаправленность свидетельствует о том, что особи паразита могут переноситься птицами, поскольку рыбацкие млекопитающие, принимающие участие в циркуляции *M. suifunensis*, обычно не перемещаются на большие расстояния, тогда как птицы способны к

длительным перелетам. Более того, многие птицы имеют тенденцию использовать ежегодно сходные миграционные маршруты, в отличие от млекопитающих, что также могло оказать влияние на формирование обнаруженных паттернов внутри популяции *M. suifunensis*. В настоящее время заразить птиц (утят) метацеркариями *M. suifunensis* в экспериментальных условиях нам не удалось, тем не менее, обнаружение *M. yokogawai* у рыбоядных птиц (Chai, Jung, 2017) предполагает возможность циркуляции *M. suifunensis* в том числе с участием птиц, поскольку исследуемый в данной работе вид ранее ошибочно относился к *M. yokogawai* на основании морфологических данных. Также по литературным данным *M. yokogawai* на территории юга Дальнего Востока России, который позже был обозначен нами как *M. suifunensis*, был обнаружен у чаек и крачек (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). Однако видовой статус этих паразитов не был подтвержден молекулярными данными, поэтому на данный момент вопрос участия птиц в циркуляции *M. suifunensis* остается открытым. Более того, не исключено, что миграционные маршруты паразита происходят и не через Китай, поскольку выборки паразита были получены из относительно небольшого количества локалитетов Приморского и Хабаровского краев. Включение в анализ большего числа особей, в том числе из Китая позволит отследить реальные пути миграции *M. suifunensis*.

Как по отдельным генам мтДНК, так и для комбинированной последовательности по всем трем маркерам (гены *nad1*, *cytb* и *cox1* мтДНК) значения обоих тестов нейтральности свидетельствует о росте популяции с большим количеством редких гаплотипов: значения критерия Таджимы D имели отрицательные отклонения от нуля (Tajima 1989; таблица 12), критерий теста Фу F_s также был меньше нуля и значим для всех наборов данных (Fu, 1997; таблица 12). Полученные результаты коррелируют с унимодальными графиками распределения попарных отличий для отдельных маркеров. Напротив, мультимодальный график для объединенных данных

(рисунок 14г) можно интерпретировать как демографическое равновесие популяции (Rogers, Harpending, 1992). Однако в этом случае сеть гаплотипов имела бы более хаотичную структуру. Но в настоящем исследовании даже на основе комбинированных данных получена простая структура с двумя звездообразными гаплогруппами. Кроме того, значения показателей *SSD* и *H_{ri}* также были незначительные, что также указывает на рост популяции. С другой стороны, бимодальное распределение графика частот попарных нуклеотидных различий для популяции *M. suifunensis* при наличии двух гаплогрупп в MST, каждая из которых имела звездообразную структуру, не противоречит гипотезе эволюционной экспансии (Marjoram, Donnelly, 1994). На основании данных, полученных для вида *M. suifunensis*, можно сделать предположение, что на стадии своего образования от общего предка, этот вид дал начало двум предковым гаплотипам, филогенетически близким друг другу. Эти гаплотипы развивались независимо друг от друга, но в настоящее время не имеют полной изоляции из-за потока генов.

Помимо этих указанных выше пиков, распределение попарных различий для комбинированного набора данных и отдельных генов показал низкочастотный пик (рисунок 14г). Для всех маркеров этот пик формировался уникальной особью из реки Бира, которая имел от 0,6 до 1% отличий (для разных маркеров) от всех остальных последовательностей *M. suifunensis*. Эти различия не являются межвидовыми, а наличие такого образца может свидетельствовать о том, что весь ареал *M. suifunensis* не покрыт выборками, используемыми в данном анализе. Например, такие гаплотипы могут встречаться в западной части среднего течения реки Амур (ближе к Благовещенску), где, по предварительным данным, этот вид также широко распространен (данные не опубликованы).

Таким образом, при использовании трех достаточно консервативных митохондриальных маркеров (гены *nad1*, *cytb* и *cox1* мтДНК) была получена информация для оценки популяционной структуры и эволюционных

процессов *M. suifunensis*. Тем не менее, многие исследователи предполагают, что молекулярные маркеры, перечисленные выше, не имеют достаточно высокого уровня полиморфизма для исследования недавних филогенетических событий из-за их недостаточной чувствительности, так как скорость накопления мутаций в исследованных последовательностях не отражает временные процессы в этих популяциях (Zarowiecki et al., 2007; Suleman et al., 2020). По этой причине, как для анализа филогенетических связей, так и для исследования популяционной структуры трематод, эти исследователи рекомендуют использовать гены *atp6*, *nad5*, *nad3*, *nad2* и *cox3*, которые имеют более высокий уровень изменчивости. Подобные выводы были сделаны при анализе митохондриальной ДНК других групп паразитических червей, например, моногеней (Zhang et al., 2018). Однако эти предположения были сделаны преимущественно на основе сравнительного анализа последовательностей близкородственных видов, а не изменчивости внутри популяций одного вида. То есть этих данных недостаточно, чтобы определить, насколько последовательности, предлагаемые авторами, будут чувствительны при анализе внутрипопуляционной изменчивости, так как различия между видами не всегда корректно отражают скорость накопления мутаций внутри вида. Например, при сравнении межвидовых генетических дистанций для *M. suifunensis* и *M. yokogawai* аналогичные значения наблюдались для всех трех маркеров (15, 16 и 15% для генов *nad1*, *cytb* и *cox1* мтДНК соответственно). Однако в популяции *M. suifunensis* уровень изменчивости, для двух генов, *nad1* и *cytb*, был в 1,4 и 1,5 раза выше, чем для гена *cox1* мтДНК, то есть межвидовые дистанции не имели 100% корреляции с уровнем изменчивости внутри вида.

Поскольку имеется мало доступных данных по оценке генетического разнообразия для представителей не только семейства Heterophyidae, но и родственного семейства Opisthorchiidae, трудно делать какие-либо масштабные выводы о причинах наличия или отсутствия подразделения

внутри вида. Тэнкхэм с соавторами (Thaenkham et al, 2016) связали обнаруженную дифференциацию внутри *H. taichui* (Heterophyidae) с коротким временем паразитирования в окончательных хозяевах, что не даёт паразиту выжить в засушливый период, в течение которого промежуточные хозяева, связанные с водной средой, могут погибнуть. Эту гипотезу можно экстраполировать на результаты, полученные для *M. suifunensis* на основе гена *cytb* мтДНК и объединенного набора данных всех трех исследованных митохондриальных генов. Если именно промежуточные хозяева оказывают влияние на распространение паразита, а между северной и южной гаплогруппами существует единственная водная связь через реку Сунгач, то за счет ее пересыхания в определенное время могла возникнуть изоляция северных и южных субпопуляций *M. suifunensis*.

Такое же подразделение внутри популяции было обнаружено для *Cryptocotyle concava* (Gonchar, 2020), представителя надсемейства Opisthorchioidea, который ранее принадлежал к семейству Heterophyidae согласно классической систематике надсемейства (Scholz, 2008), но позднее на основании анализа комбинированных данных отнесен к семейству Opisthorchiidae (Tatonova, Besprozvannykh, 2019). Тем не менее, несмотря на включение в другое семейство, как и *M. suifunensis*, эти трематоды также относятся к кишечным паразитам и существуют в окончательном хозяине в течение ограниченного времени (Wootton, 1957), что подтверждает гипотезу Тэнкхам (Thaenkham et al., 2016). Однако выявленное подразделение в структуре популяции *C. concava* может быть связано и с тем, что в исследовании использовали редии, полученные из отдельных моллюсков, который в качестве первого промежуточного хозяина показал высокий коэволюционный потенциал и оказал влияние на высокий уровень генетического разнообразия паразита (Laorrom et al., 2012). Это согласуется с данными, полученными для *Metagonimus* sp. из моллюска *Semisulcospira libertina*, для которого уровень изменчивости внутри вида был в 10 раз выше

(0,9%), чем у *M. suifunensis* (0,09%), несмотря на меньший размер выборки представителя этого рода из Японии.

Тем не менее, если вернуться к гипотезе Тэнкхам с соавторами (Thaenkham et al., 2016), сомнения в ней возникают ещё и потому, что длительные периоды засухи в разные геологические эпохи должны были оказывать значительное влияние не только на водные организмы, но и на число окончательных хозяев, которые используют рыбу в качестве источника пищи. Короткие засушливые периоды также не могли существенно повлиять на структуру популяции, поскольку они сменяются затоплениями, что позволяет паразиту свободно циркулировать через хозяев по всему ареалу. Вместе с тем, мнение Тэнкхам с соавторами (Thaenkham et al., 2016) подтверждается данными, полученными для описторхид, *Clonorchis sinensis* и *Opisthorchis felineus*, которые длительное время паразитируют в окончательном хозяине (Attwood, Chou, 1978; Pakharukova, Mordvinov 2016), что приводит к отсутствию дифференциации внутри популяции (Brusentsov et al., 2013; Chelomina et al., 2014). Однако выводы по описторхису требуют проверки, поскольку Брусенцовым и соавторами (Brusentsov et al., 2013) были использованы короткие последовательности митохондриальных генов, а ранее Челоминой с соавторами (Chelomina et al., 2014) показано, что разные участки митохондриальных маркеров имеют разную чувствительность, то есть для *O. felineus* могли быть выбраны неподходящие маркеры, поэтому интерпретировать эти результаты нужно с осторожностью.

В завершение рассуждения о выборе подходящего маркера необходимо подчеркнуть, что даже в случае сравнения популяционной структуры близкородственных видов в пределах одного рода и при использовании идентичных последовательностей, зачастую можно получить результаты, которые довольно трудно интерпретировать. Так, например, остаются вопросы, почему в исследовании Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) с использованием коротких последовательностей гена *cox1* мтДНК для

видового комплекса *M. miyatai*, гаплотипическая сеть показала разделение на три основные гаплогруппы, связанные с географическим распространением паразитов, тогда как этот же маркер оказался неэффективным в случае анализа популяций двух других видов – *M. saitoi* в том же исследовании и *M. suifunensis* с гораздо более обширной территории, включающей Приморский и Хабаровский края, а также Еврейскую Автономную область.

Поэтому при всей значимости упомянутых выше исследований, а также данных, полученных для популяции *Metagonimus suifunensis* в настоящей работе, для понимания причин возникновения особенностей популяционной структуры паразитов, перечисленных выше, необходимы дополнительные данные по разным представителям Opisthorchioidea с оценкой чувствительности различных маркеров для каждого вида, включая представителей рода *Metagonimus*. К сожалению, идеальные маркеры для изучения популяционной структуры всех видов подобрать невозможно, поэтому необходимо тестировать разные участки генома на предмет их пригодности. Помимо подбора маркеров для каждой группы организмов, необходимо учитывать морфологические признаки, особенности жизненных циклов с учетом влияния разных хозяев, генетические данные, а также результаты филогенетического и популяционного анализа.

Таким образом, настоящая работа показала, что только с применением комплексного подхода стало возможно уточнение таксономического статуса двух видов, *M. suifunensis* и *M. pusillus*, а использование нескольких митохондриальных маркеров выявило дифференциацию внутри вида *M. suifunensis* и миграционные потоки между структурными единицами внутри его популяции, которые зависят от исторических процессов и отражают состояние вида в настоящее время. Полученные данные важны для прогнозирования путей миграции паразита, выявления состава паразитофауны региона, а также определения перспектив создания методов

диагностики для эндемичных видов, циркулирующих на территории юга Дальнего Востока России.

3.6. Эпидемиология метагонимоза

Трематодозы, в том числе метагонимоз, оказывают влияние на здоровье трудоспособного населения и, в конечном счете, способны вызвать экономические потери. Из известных в настоящее время 14 видов данного рода (с учетом данных Nakaо et al., 2022) пять видов зарегистрированы как паразиты человека: *M. yokogawai*, *M. takahashii*, *M. minutus*, *M. miyatai*, *M. katuradai* (Chai et al., 2005; Chai, 2015, Chai, 2017) и *M. suifunensis* (= *M. yokogawai* согласно Беспрозванных и др., 2012). *Metagonimus yokogawai* является наиболее часто регистрируемым из них, в связи с этим для него имеется большее количество информации.

Наиболее высокая зараженность населения метагонимозом наблюдается в странах, где существует традиция употребления в пищу сырой рыбы (Чертов и др., 2013). В Корее этот показатель достигает 53-76%. Почти все большие и малые реки на восточном и южном побережье Корейского полуострова, где обитает промысловая рыба *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel, 1846), являются очагами метагонимоза (Гаевская, 2015; Yu et al., 1994). В Японии в период с 1930х по 1950-е гг. зараженность населения в разных районах варьировала от 1 до 50% (Ito, 1964). После 70-х гг. встречаемость *M. yokogawai* среди жителей Японии стала снижаться, за исключением некоторых поселений у озера Хамана (Гаевская, 2015; Chai et al., 2005).

В Китае отмечено, что в некоторых районах зараженность населения достигает 80% (Чертов и др., 2013). В провинции Гуанси с помощью ПЦР-анализа на основе последовательностей митохондриального гена *cox1* мтДНК из 46 инфицированных трематодозами людей выявлено восемь человек, зараженных *M. yokogawai* (Jeon et al., 2012). Очаги заражения человека

обозначены и в провинциях Гуандун, Анхой, Хубей, Чжецзян (Yu et al., 1994), а также на Тайване, где данный паразит был впервые описан (Chai, 2015).

На Дальнем Востоке России, в том числе в Приморском, Хабаровском крае и Амурской области, распространен *M. suifunensis* (= *M. yokogawai*) (Ошмарин, 1963). В исследовании Чертова с соавторами (2013) говорится о высокой зараженности метагонимозом коренного населения Амурской области (15-25%). Здесь же была зарегистрирована высокая инфицированность домашних и диких плотоядных животных, что свидетельствует о наличии очагов заболевания. В Приморском крае, по данным Беспрозванных и Ермоленко (2005), распространение *M. suifunensis* привязано к местам обитания первых промежуточных хозяев (моллюски рода *Parajuga*). Так, в бассейне реки Раздольная зараженность моллюсков составляет 0,45-6,9%, в реке Комиссаровка – 0,5%, в реке Илистая – 3,6%, и 0,3 -1,4% в реке Уссури. Метацеркарии были выявлены более, чем у 50 видов рыб, в том числе лососевых, являющихся объектами любительского лова. Так, в среднем и верхнем течении реки Арму были заражены такие виды, как *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773), *B. tumensis* Mori, 1930, *Hucho taimen* Pallas, 1773 с экстенсивностью инвазии до 33,3% (Ермоленко, Беспрозванных, Шедько, 1998). Из окончательных хозяев наибольшая зараженность зарегистрирована у рыбоядных птиц (Беспрозванных, Ермоленко, 2005). На территории Приморского края также регистрировались случаи метагонимоза у человека: в 1995 году – 5 заболевших, в 2005 г. – двое заболевших (Ермоленко и др., 2015), а в 2017 г. был выявлен один случай метагонимоза при исследовании удаленного отростка больного с аппендицитом (Ермоленко и др., 2020).

Взрослые особи паразитов в тонком кишечнике вызывают катаральное воспаление слизистой оболочки, повреждение ворсинок кишечника, воспалительные реакции различной степени, а продукты жизнедеятельности

паразита провоцируют аллергические реакции (Беспрозванных, Ермоленко, 2005; Чертов и др., 2013). При низкой инфицированности заболевание может протекать бессимптомно, а высокая инвазия сопровождается снижением аппетита, болью в верхней части живота, тошнотой, диареей и субфебрильной температурой.

По нашим экспериментальным данным, продолжительность жизни *M. suisfunensis* в окончательном хозяине (крысы) составляет менее 30 суток. Японские авторы также указывают, что инвазия во многих случаях заканчивается самопроизвольным выздоровлением (Yamada et al., 2008). Однако сложно спрогнозировать, какое влияние на здоровье человека может оказать паразит в каждой отдельной ситуации. В литературе описан случай заражения метагонимозом, который вызвал мелкие мозговые кровоизлияния у больного диабетом, кишечные симптомы при этом отсутствовали, но проявились позднее. Более того, авторы заключили, что сам диабет мог быть вызван паразитарной инфекцией (Yamada et al., 2008).

Помимо этого, по результатам наших исследований, популяция *M. suisfunensis* на Дальнем Востоке неоднородна, и в ней присутствуют различные гаплотипы. Не исключено, что паразиты с разными генетическими особенностями могут отличаться и по способности инфицирования и патогенезу в хозяине. Так, например, ранее для *Clonorchis sinensis* было высказано предположение, что именно аминокислотная замена в функциональном сайте последовательностей *cox1* мтДНК привела к лекарственной устойчивости паразита из Вьетнама (Chelomina et al., 2014).

По данным нашего исследования, на территории юга Дальнего Востока циркулируют два вида рода *Metagonimus*. Проведенные морфологические и генетические исследования показали, что *M. yokogawai* в исследуемом регионе является синонимом *M. suisfunensis*, и этот вид обнаруживался во всем регионе, до северных границ ареала. На территории Японии, в результате исследования Накао с соавторами (Nakao et al., 2022),

затронувшего все крупные острова Японского архипелага, *M. suifunensis* не обнаружен, что говорит о небольшой вероятности его миграции с континентальной части, и свидетельствует о том, что *M. suifunensis* – эндемичный вид, широко распространенный на юге Дальнего Востока России.

Другой эндемичный вид, *M. pusillus* (= *M. katsuradai*), менее распространен в указанном регионе: в Приморском крае на данный момент выявлен только бассейне реки Раздольная. Данный вид также не обнаружен в Японии, из чего можно предположить, что случаи заражения населения на Дальнем Востоке связаны именно с *M. suifunensis*, а *M. pusillus* существенного эпидемиологического значения не имеет. Однако для исключения вероятности заражения человека *M. pusillus*, необходимо провести исследования естественной зараженности окончательных хозяев, в роли которых выступают разные млекопитающие, в том числе человек.

Нужно отметить, что для диагностики метагонимоза у населения наиболее часто применяют методы копроовоскопического анализа и серологические тесты, включая ИФА, которые не позволяют определить видовую принадлежность паразита (Ермоленко и др., 2020). Кроме того, при низкой интенсивности инвазии возможны ложноотрицательные результаты. Так при заражении человека менее, чем 100 особями *Metagonimus*, вероятность обнаружения яиц паразита в мазке по методу Като-Кац, близка к нулю (Chai, 2015). Также использование этих методов для мониторинга зараженности разных хозяев может вызывать трудности при идентификации видов рода *Metagonimus*. В связи с этим, полученные в настоящее время данные могут лечь в основу разработки молекулярных диагностикомов, позволяющих достоверно определять паразитов на разных стадиях жизненного цикла, а также выявить возможное наличие других видов на территории юга Дальнего Востока России.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексного подхода, включающего данные о морфологических и молекулярно-генетических характеристиках, выявлено, что на юге Дальнего Востока России осуществляют циркуляцию два новых для науки вида *M. suifunensis* Shumenko, Tatonova & Besprozvannykh, 2017 и *M. pusillus* Tatonova, Shumenko & Besprozvannykh, 2018, ранее относившихся к видам *M. yokogawai* Katsurada, 1912 и *M. katsuradai* Izumi, 1935 соответственно.

2. Установлено, что ультраструктура шипиков на поверхности тела половозрелой стадии *M. suifunensis* является основным дифференцирующим критерием, отделяющим его от наиболее близкого вида *Metagonimus yokogawai* и других морфологически сходных представителей рода.

3. Валидность новых видов подтверждается результатами филогенетического анализа по данным ядерных и митохондриальных маркеров, на основе которых виды формируют отдельные кластеры с высокой статистической поддержкой, а генетические дистанции между *M. suifunensis*, *M. pusillus* и другими представителями *Metagonimus* находятся в диапазоне межвидовых отличий внутри рода.

4. Показано, что известные восточноазиатские представители рода *Metagonimus* на половозрелой стадии разделяются на две группы по длине тела. Одна из групп объединяет червей с длиной тела более 0,65 мм (*Metagonimus suifunensis*, *M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai*), другая включает более мелких паразитов с длиной тела, не превышающей это значение (*Metagonimus pusillus*, *M. hakubaensis*, *M. minutus*, *M. katsuradai*, *M. otsurui* и *M. ovatus*). Это подтверждается данными по гену 28S рРНК, согласно которым на филогенетической реконструкции виды группируются в соответствии с их разделением по метрическому показателю.

5. По данным гена *cytb* мтДНК, а также комбинированной последовательности генов *cytb*, *nad1* и *cox1* мтДНК в структуре дальневосточной популяции *Metagonimus suifunensis* выявлено наличие северной и южной гаплогрупп, отличающихся на одну несинонимичную замену и ассоциированных с географическим распределением выборок в бассейнах рек Амур и Раздольная.

6. Более высокий уровень генетического разнообразия среди особей *M. suifunensis* из северных субпопуляций в сравнении с выборками из южных локалитетов свидетельствует о том, что центр формирования популяции этого вида находился на севере ареала, откуда впоследствии происходило его расселение в западном и южном направлениях.

7. Наличие в северной субпопуляции *M. suifunensis* (р. Бира) 42% особей, по молекулярным показателям относящихся к южной гаплогруппе, указывает на происходящую миграцию паразита с юга на север, что согласуется с высоким значением потока генов. В составе северной гаплогруппы выявлен единичный экземпляр паразита из реки Одарка, являющейся южным локалитетом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беянина, Н.И., Беянин, П.С., Митюрева, Е.В. Новое свидетельство переориентации стока р. Раздольной в плейстоцене, Южное Приморье // Тихоокеан. геология. 2009. Т. 28. № 2. С. 99-102.
2. Беспрозванных, В.В. Фауна, биология, экология партенит и церкарий трематод моллюсков рода *Juga* (Pachychilidae) из рек Приморского края. – Владивосток: Дальнаука, 2000. – 120 с.
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., Дворянкин, В.А. К обнаружению *Metagonimus katsuradai* Isumi, 1935 (Trematoda: Heterophyidae) в Южном Приморье // Гельминты и вызываемые ими заболевания. 1987. С. 47-52.
5. Беспрозванных, В.В., Ермоленко А.В., Надточий Е.В. Паразиты животных и человека юга Дальнего Востока. Часть 2: Трематоды. – Владивосток: Дальнаука, 2012. – 238 с.
6. 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.
7. Богатов, В.В., Беспрозванных, В.В., Прозорова, Л.А. Опасные паразитозы на юге Дальнего Востока России в условиях климатических и демографических изменений // Доклады Академии Наук. 2019. Т. 487. № 4. С. 465-468.
8. Богатов, В.В., Питч, Т.У., Стороженко, С.Ю., Баркалов, В.Ю., Лелей, А.С., Холин, С.К., Крестов, П.В., Костенко, В.А., Макараченко, Е.А., Прозорова, Л.А., Шедько, С.В. Особенности формирования наземной и

пресноводной биоты острова Сахалин // Вестник ДВО РАН. 2006. Вып. 2. С. 32-47.

9. Гаевская, А.В. Мир паразитов человека. I. Трематоды и трематодозы пищевого происхождения. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2015. – 410 с.

10. Гинецинская Т.А., Добровольский А.А. Новый метод обнаружения сенсилл личинок трематод и значение этих образований для систематики // Доклады АН СССР, 1963. Т. 151. № 2. С. 460-463.

11. Ермоленко А.В., Беспрозванных В.В., Шедько С.В. Фауна паразитов лососевых рыб (Salmonidae, Salmoniformes) Приморского края. Владивосток, 1998. – 88 с.

12. Ермоленко, А.В., Беспрозванных, В.В., Румянцева, Е.Е., Воронок, В.М. Возбудители трематодозов людей в Приморском крае // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2015. № 2. С. 6-10.

13. Катохин, А.В., Шеховцов, С.В., Конков, С., Юрлова, Н.И., Сербина, Е.А., Водяницкая, С.Н., Федоров, К.П., Локтев, В.Б., Муратов, И.В., Охяма, Ф., Махнёва, Т.В., Пельтек, С.Е., Мордвинов, В.А. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1- последовательностям // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 421, № 8. С. 214-217.

14. Короткий, А.М., Гребенникова, Т.А., Пушкарь, В.С., Разжигаева, Н.Г. Климатические смены на территории юга Дальнего Востока в позднем кайнозое (миоцен-плейстоцен) / Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1996. – 56 с.

15. Марсан П.А. Олденброк, К. Молекулярные маркеры – инструмент исследования генетического разнообразия в: «Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства» / ФАО, 2010. ВИЖ РАСХН, 2010. Москва / Перевод с англ. ФАО. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome.

16. Матюшков, Г.В., Соловьев, А.В., Мельников, О.А. Геологическое прошлое острова Сахалин / ГБУК «Сахалинский областной краеведческий музей», 2014 – 124 с.

17. Млынар, Е.В., Хованский, И.Е. Экологические аспекты увеличения показателя общей заболеваемости по метагонимозу в населенных пунктах Хабаровского края // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019. № 3. С. 61-65.

18. Морозов, Ф.Н. Надсемейство Heterophyoidea Faust, 1929 / Скрыбин К.И. (ред.) Трематоды человека и животных. М: 1952. АН СССР. С. 153-615.

19. Ошмарин, П.Г. Паразитические черви млекопитающих и птиц Приморского края. – Изд-во Академии наук СССР, 1963. – 322 с.

20. Подолько, Р.Н., Самсоненко И.А. Изучение *Metagonimus yokogawai* в Амурской области // Естественные и технические науки. 2012. № 3. С.143-144.

21. Посохов, П.С. Клонорхоз в Приамурье – Хабаровск: Изд-во Дальневост. гос. мед. университета, 2004. – 187 с.

22. Расщепкина, А.В. Первые сведения по строению паллиального овидукта брюхоногих моллюсков рода *Hua* Chen, 1943 (Gastropoda, Pleuroceridae) из Китая // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. 2011. Вып. 5. С. 454-457.

23. Скрыбин, К.И. Трематоды животных и человека – М.: АН СССР, 1952. Т. 6. – 567 с.

24. Скрыбин, К.И., Подъяпольская, В.П., Шульц, Р.С. Метагонимоз людей и животных в Дальневосточном крае // Тропическая медицина и ветеринария. 1930. № 6-7. С. 16-25.

25. Харьков, В.Н. Структура и филогеография генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы / Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Томск, 2012 – 45 с.

26. Чертов, А.Д., Целуйко, С.С., Подолько, Р.Н. Японская двуустка в Амурской области. Жизненный цикл и эпидемиология – Благовещенск : ООО «АБГМА», 2013. – 104 с.

27. Чуелов, С.Б., Россина, А.Л. Трематодозы печени, желчных и панкреатических протоков (инвазии, вызванные печеночными сосальщиками) // Детские инфекции. 2020. № 19. С. 26-33.

28. Шатров, А.С. Биология *Metagonimus yokogawai* Katsurada в Верхнем Приамурье // Паразитология. 1974. Т. VIII, №3. С. 196-199.

29. Ahn, Y.-K. Intestinal flukes of genus *Metagonimus* and their second intermediate hosts in Kangwon-do // Korean Journal of Parasitology. 1993. Vol. 31, № 4. P. 331-340.

30. Arimatsu, Y., Kaewkes, S., Laha, T., Sripa, B. Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting parasite microsatellites // Acta Tropica. 2015. Vol. 141, part B. P. 368-371.

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

32. Attwood, H.D., Chou, S.T. The longevity of *Clonorchis sinensis* // Pathology. 1978. Vol. 10. P. 153-156.

33. Belden, L.K., Peterman, W.E. Smith, S.A., Brooks, L.R. Benfield, E.F., Black, W.P., Yang, Z., Wojdak, J.M. *Metagonimoides oregonensis* (Heterophyidae: Digenea) infection in Pleurocerid snails and *Desmognathus quadramaculatus* salamander larvae in Southern Appalachian streams // Journal of Parasitology. 2012. Vol. 98. P. 760-767.

34. Besprozvannykh, V.V., Atopkin, D.M., Ngo, H.D., Beloded, A.Yu., Ermolenko, A.V., Ha, N.V., Tang, N.V. The trematode *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 (Digenea: Haploporidae), a mullet parasite (Mugilidae) from Peter

the great bay of the sea of Japan and from Vietnamese waters of the Gulf of Tonkin: Morphology and molecular data // *Parasitology*. 2015. Vol. 41. P. 289-294.

35. Bowles, J., McManus, D.P. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994. Vol. 50. P. 33-44.

36. 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., Shibitov S.K., Suleymanov M.M., Yevtushenko A.V., Mordvinov V.A. Low genetic diversity in wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felineus* suggests special demographic history of this trematode species // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8. Issue 4. e62454.

37. Bunnell, F.L., Campbell, R.W., Squires, K.A. Conservation priorities for peripheral species: the example of British Columbia // *Canadian Journal of Forest Research*. 2004. Vol. 34. P. 2240-2247.

38. 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) // *Parasitology Research*. 2012. Vol. 110. P. 235-243.

39. Cech, G., Gyöngy, M., Sándor, D., Molnár, K., Sellyei, B., Varga, Á., Székely, C. Molecular evidence of the absence of *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) in Europe: report of *Metagonimus* sp. in cyprinoid fish from the River Danube in Hungary // *Parasitology Research*. 2023. Vol. 122. P. 2325-2334.

40. Chai, J.-Y. Human Intestinal Flukes. From Discovery to Treatment and Control / Springer Nature, 2019. 555 p.

41. Chai, J.-Y. *Metagonimus* in: *Biology of Foodborne Parasites*. Editors: Xiao L., Ryan U., Feng Y. / CRC Press, 2015. – 497 p.

42. Chai, J.-Y., Guk, S.-M., Han, E.-T., Seo, M., Shin, E.-H., Sohn, W.-M., Choi, S.-Y., Lee, S.-H. Surface ultrastructure of *Metagonimus takahashii* metacercariae and adults // Korean Journal of Parasitology. 2000. Vol. 38. P. 9-15.
43. Chai, J.-Y., Jung, B.-K. Fishborne zoonotic heterophyid infections: An update // Food and Waterborne Parasitology. 2017. Vol. 8-9. P. 33-63.
44. Chai, J.-Y., Kang, J.-Y., Choi, S.-Y., Guk, S.-M., Yu, J.-R., Lee, S.-H. Surface ultrastructure of *Metagonimus miyatai* metacercariae and adults // Korean Journal of Parasitology. 1998. Vol. 36. P. 217-225.
45. Chai, J.-Y., Murrell, K.D., Lymbery, A.J. Fishborne parasitic zoonoses: status and issues // International Journal for Parasitology. 2005. Vol. 35. P. 1233-1254.
46. Chelomina, G.N., Tatonova, Y.V., Hung, N.M., Ngo, H.D. Genetic diversity of the Chinese liver fluke *Clonorchis sinensis* from Russia and Vietnam // International Journal for Parasitology. 2014. Vol. 44, Issue 11. P. 795-810.
47. Dao, T.T.H., Nguyen, T.T.G., Gabriel S., Bui, K.L., Dorny, P., Le, T.H. Updated molecular phylogenetic data for *Opisthorchis* spp. (Trematoda: Opisthorchioidea) from ducks in Vietnam // Parasites & Vectors. 2017. Vol. 10. P. 575.
48. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. Vol. 9. P. 772.
49. Dung, D.T., Hop, N.T., Thaenkham, U., Waikagul, J. Genetic differences among Vietnamese *Haplorchis taichui* populations using the COI genetic marker // Journal of Helminthology. 2013. Vol. 87: P. 66-70.
50. Elliott, T., Muller, A., Brockwell, Y., Murphyc, N., Grillo, V., Toet, H.M., Anderson, G., Sangster, N., Spithill, T.W. Evidence for high genetic diversity of *NAD1* and *COX1* mitochondrial haplotypes among triclabendazole resistant and susceptible populations and field isolates of *Fasciola hepatica* (liver fluke) in Australia // Veterinary Parasitology. 2014. Vol. 200. P. 90-96.

51. Excoffier, L., Schneider, S. Why hunter-gatherer populations do not show signs of pleistocene demographic expansions // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1999. Vol. 96. P. 10597-10602.

52. Fischer, P.U., Curtis, K.C., Marcos, L.A. Weil, G.J. Molecular characterization of the North American lung fluke *Paragonimus kellicotti* in Missouri and its development in Mongolian gerbils // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011. Vol. 84. P. 1005-1011.

53. Fu, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. Vol. 147. P. 915-925.

54. Gonchar, A. Genetic diversity in monoxenous and trixenous digeneans sharing one molluscan host species // Parazitologiya. 2020. Vol. 54. 491-503.

55. Guindon, S., Gascuel, O. PhyML: "A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // Systematic Biology. 2003. Vol. 52. P. 696-704.

56. Harpending, H. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution // Human Biology. 1994. Vol. 66. P. 591-600.

57. Hayashi, T., Iwata, H.A. Bayesian method and its variational approximation for prediction of genomic breeding values in multiple traits // BMC Bioinformatics. 2013. Vol. 14. P. 34.

58. Howell, N. Evolutionary conservation of protein regions in the proton-motive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis // Journal of Molecular Evolution. 1989. Vol. 29. P. 157-169.

59. Howell, N. Evolutionary conservation of protein regions in the proton-motive cytochrome *b* and their possible roles in redox catalysis // Journal of Molecular Evolution. 1989. Vol. 29. P. 157-169.

60. Howell, N., Gilbert, K. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Molecular Biology. 1988. Vol. 203. P. 607-618.

61. Howell, N., Gilbert, K. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome *b* gene // *Journal of Molecular Biology*. 1988. Vol. 203. P. 607-618.
62. Hudson, R. Gene genealogies and coalescent process // *Oxford surveys in evolutionary biology*. 1991. Vol. 7. P. 1-44.
63. Imura, H. Development of Ayu fry supply and Ayu culture industry in Shiga prefecture // *Chiiki Gyogyo Kenkyu*. 2013. Vol. 53. P. 25-45 (In Japanese).
64. Ito, J. A monograph of cercariae in Japan and adjacent territories // *Prog. Medical Parasitology*. 1964c. Vol. 1. P. 395-550.
65. Ito, J. *Metagonimus* and other human heterophyid trematodes // K. Morishita, Y. Komiya, H. Matsubayashi (Eds) *Progress of medical parasitology in Japan*. Tokyo, Meguro Parasitological Museum. 1964b. Vol. 1. P. 314-393.
66. Ito, J. *Metagonimus* and other human heterophyid trematodes.// *Progress of Medical Parasitology in Japan*. 1964a. Vol. 1. P. 317-393.
67. Izrailskaya, A.V., Besprozvannykh, V.V., Tatonova, Y.V., Nguyen, H.M., Ngo, H.D. Developmental stages of *Notocotylus magniovatus* Yamaguti, 1934, *Catatropis vietnamensis* n. sp., *Pseudocatatropis dvoryadkini* n. sp., and phylogenetic relationships of Notocotylidae Lühe, 1909 // *Parasitology Research*. 2019. Vol. 118. P. 469-481
68. Jarne, Ph., Lagoda P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back // *TREE*. 1996. Vol. 11. P. 424-429.
69. Jeon, H.-K., Lee, D., Park, H., Min, D.-Y., Rim, H.-J., Zhang, H., Yang, Y., Li, X., Eom, K.S. Human infections with liver and minute intestinal flukes in Guangxi, China: Analysis by DNA Sequencing, Ultrasonography, and Immunoaffinity Chromatography // *Korean Journal of Parasitology*. 2012. Vol. 50. P. 391-394.
70. Kudo, N., Shigeta, K., Matsumoto, K., Oymayada T. Discovery of natural infection by *Metagonimus hakubaensis* Shimazu, 1999 (Trematoda: Heterophyida) in Japanese water shrews (*Chimarrogale platycephala*) in Japan // *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014. Vol. 76. P. 1531-1533.

71. Laoprom, N., Sithithaworn, P., Andrews, R.H., Ando, K., Laha, T., Klinbunga, S., Webster, J.P., Petney T.N. Population genetic structuring in *Opisthorchis viverrini* over various spatial scales in Thailand and Lao PDR // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012. Vol. 6. e1906.

72. Lapiere, A.R. Molecular phylogeny of the trematode families Diplostomidae and Strigeidae – Quebec, Canada, 2011. – 133p.

73. Lee, E., Kim, S., Nam, S. Paleo-Tsushima Water and its effect on surface water properties in the East Sea during the last glacial maximum: revisited // Quaternary International. 2008. Vol. 176-177. P. 3-12.

74. Lee, S.-H., Seo, B.-S., Chai, J.-Y., Hong, S.-J. Study on *Metagonimus yokogawai* (Katsuradai, 2012). Electron microscopic observation on the tegumental structure // Korean Journal of Parasitology. 1984. Vol. 22. P. 1-10.

75. Lee, S.-U., Huh, S., Sohn, W.-M., Chai, J.-Y. Sequence comparisons of 28S ribosomal DNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I of *Metagonimus yokogawai*, *M. takahashii* and *M. miyatai* // Korean Journal of Parasitology. 2004. Vol. 42. P. 129-135.

76. Lesica, P., Allendorf, F.W. When are peripheral populations valuable for conservation? // Conservation Biology. 1995. Vol. 9. P 753-760.

77. Librado, P., Rozas, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451-1452.

78. 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 // Journal of Helminthology. 2012. Vol. 86. P. 479-84.

79. Luton, K., Walker, D., Blair, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Trematoda: Digenea) // Molecular and Biochemical Parasitology. 1992. Vol. 56. P. 323-328.

80. Marjoram, P., Donnelly, P. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution // *Genetics*. 1994. Vol. 136. P. 673-683.

81. Miura, O., Urabe, M., Mori, H., Chiba, S. Ancient drainage networks mediated a largescale genetic introgression in the East Asian freshwater snails // *Ecology and Evolution*. 2020. Vol. 10. P. 8186–8196.

82. Morgan, J.A.T., 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.

83. Nakao, M., Ishikawa, T., Hibino, Y., Ohari, Y., Taniguchi, R., Takeyama, T., Nakamura, Sh., Kakino, W., Ikadai, H., Sasaki, M. Resolution of cryptic species complexes within the genus *Metagonimus* (Trematoda: Heterophyidae) in Japan, with descriptions of four new species // *Parasitology International*. 2022. Vol. 90. P. 102605.

84. Nakao, M., Sasaki, M. Trematode diversity in freshwater snails from a stopover point for migratory waterfowls in Hokkaido, Japan: An assessment by molecular phylogenetic and population genetic analyses // *Parasitology International*. 2021. Vol. 83. P. 102329.

85. Nei, M., Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979. Vol. 76. P. 5269-5273.

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

87. Pakharukova, M.Y., Mordvinov, V.A. The liver fluke *Opisthorchis felinus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential // *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016. Vol. 110. P. 28-36.

88. Parvathi, A., Umesha, K.R., Kumar, S., Sithithaworn, P., Karunasagar, I., Karunasagar, I. Development and evaluation of a polymerase chain reaction

(PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish // *Acta Tropica*. 2008. Vol. 107. P. 13-16.

89. Pearson, J. Family Heterophyidae Leiper, 1909 / R.A. Bray, D.I. Gibson, A. Jones (Eds) *Keys to the Trematoda*, Vol 3. London. CAB International, Wallingford. UK & The Natural History Museum. P. 113-141.

90. Pornruseetairatn, S., Kino, H., Shimazu, T., Nawa, Y., Scholz, T., Ruangittichai, J., Saralamba, N.T., Thaenkham, U. A molecular phylogeny of Asian species of the genus *Metagonimus* (Digenea) – small intestinal flukes – based on representative Japanese populations // *Parasitology Research*. 2016. Vol. 115. P. 1123-1130.

91. Posada, D., Crandall, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics*. 1998. Vol. 14. P. 817-818.

92. Qiu, J.-H., Zhang, Y., Zhang, X.-X., Gao, Y., Li, Q., Chang, Q.-C., Wang, C.-R. Metacercaria infection status of fishborne zoonotic trematodes, except for *Clonorchis sinensis* in fish from the Heilongjiang province, China // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2017. Vol. 14. P. 440-446.

93. Rannala, B.H. Comparative evolutionary genetics of trematode parasites (Plagiorchiidae) and their anuran hosts // *Canadian Journal of Zoology*. 1992. Vol. 70. P. 993-1000.

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

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

96. Saito, S. On the differences between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus takahashii*. II. The experimental infections to the second intermediate hosts // *Japanese Journal of Parasitology*. 1973. Vol. 22. P. 39-44.

97. Saito, S., Chai, J.Y., Kim, K.H., Lee, S.H., Rim, H.J. *Metagonimus miyatai* sp. nov. (Digenea: Heterophyidae), a new intestinal trematode transmitted

by freshwater fishes in Japan and Korea // Korean Journal of Parasitology. 1997. Vol. 35. P. 223-232.

98. Semyenova, S.K., Morozova, E.V., Chrisanova, G.G., Gorokhov, V.V., Arkhipov, I.A., Moskvina, A.S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P. Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* genes // Journal of Parasitology. 2006. Vol. 92. P. 525-530.

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

100. Shekhovtsov, S.V., Katokhin, A.V., Kolchanov, N.A., Mordvinov, V.A. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) // Parasitology International. 2010. Vol. 59. P. 100-103.

101. Shimazu, T. Life cycle and morphology of *Metagonimus miyatai* (Digenea: Heterophyidae) from Nagano, Japan // Parasitology International. 2002. Vol. 51. P. 271-280.

102. Shimazu, T. *Metagonimus hakubaensis* sp. n. (Digenea, Heterophyidae) from Nagano, Japan // Bulletin of the National Science Museum, Ser A (Zool). 1999. P. 87-99.

103. Shimazu, T. Morphology of metacercariae and adults of *Metagonimus katsuradai* Izumi (Digenea, Heterophyidae) from Shiga, Japan // Bulletin of the National Science Museum, Ser A. 2003. Vol. 29. P. 47-51.

104. Shimazu, T., Kino, H. *Metagonimus yokogawai* (Trematoda: Heterophyidae): from discovery to designation of a neotype // Korean Journal of Parasitology. 2015. Vol. 53. P. 627-639.

105. Shimazu, T., Urabe, M. Morphology and life cycle of *Metagonimus otsurui* (Digenea: Heterophyidae) from Nara, Japan // Bulletin of the National Museum of Nature and Science series (Zoology). 2002. Vol. 25. P. 21-28.

106. Shumenko, P.G., Tatonova, Y.V., Besprozvannykh, V.V. *Metagonimus suisfunensis* sp. n. (Trematoda: Heterophyidae) from the Russian Southern Far East: morphology, life cycle, and molecular data // *Parasitology International*. 2017. Vol. 66. P. 982-991.

107. Shumenko, P.G., Tatonova, Y.V. Assessing the population structure of trematode *Metagonimus suisfunensis* using three mitochondrial markers // *Parasitology Research*. 2022. Vol. 121. P. 915-923.

108. Sithithaworn, P., Srisawangwong, T., Ando, K., Petney, T.N., Chilton, N.B., Andrews, R.H. Genetic variation in *Opisthorchis viverrini* (Trematoda: Opisthorchiidae) from northeast Thailand and Laos PDR based on random amplified polymorphic DNA analyses // *Parasitology Research*. 2007. Vol. 100. P. 613-617.

109. Slatkin, M. Gene flow in natural populations // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 1985. Vol. 16. P. 393-430.

110. Suleman, K.M.S., Tkach, V.V., Muhammad, N., Zhang, D., Zhu, X.-Q. Molecular phylogenetics and mitogenomics of three avian dicrocoeliids (Digenea: Dicrocoeliidae) and comparison with mammalian dicrocoeliids. *Parasites Vectors*. 2020. Vol. 13, Article number – 74.

111. Swofford, D. L. PAUP^{*}; Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4.0b10 / Sunderland, MA : Sinauer, 2002.

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

113. Takahata, N., Slatkin, M. Mitochondrial gene flow // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 1984. Vol. 81. P. 1764-1767.

114. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. Vol. 28. P. 2731-2739.

115. Tang, Z.-L., Huang, Y., Yu, X.-B. Current status and perspectives of *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis: epidemiology, pathogenesis, omics, prevention and control // *Infection Diseases of Poverty*. 2016. Vol. 5, Article number – 71.
116. Tatonova, Y.V., Besprozvannykh, V.V. Description of a new species, *Cryptocotyle lata* sp. nov., and discussion of the phylogenetic relationships in Opisthorchioidea // *Parasitology International*. 2019. Vol. 72. P. 101939.
117. Tatonova, Y.V., Besprozvannykh, V.V., Shumenko, P.G., Nguyen, H.M., Solodovnik, D.A. First description of genetic diversity for the genus *Metagonimus* using the complete cox1 gene sequence // *International Journal for Parasitology*. 2019. Vol. 49. P. 985-992.
118. Tatonova, Y.V., Chelomina, G.N., Besprozvannykh, V.V. Genetic diversity of nuclear ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East // *Parasitology International*. 2012. Vol. 61. P. 664-674.
119. Tatonova, Y.V., Chelomina, G.N., Nguyen, H.M. Inter-individual and intragenomic variations in the ITS region of *Clonorchis sinensis* (Trematoda: Opisthorchiidae) from Russia and Vietnam // *Infection, Genetics and Evolution*. 2017. Vol. 55. P. 350-357.
120. Tatonova, Y.V., Izrailskaia, A.V., Besprozvannykh, V.V. *Stephanoprora amurensis* sp. nov., *Echinochasmus milvi* Yamaguti, 1939 and *E. suifunensis* Besprozvannykh, 1991 from the Russian southern Far East and their phylogenetic relationships within the Echinochasmidae Odhner 1910 // *Parasitology*. 2020. Vol. 147. P. 1469-1479.
121. Tatonova, Y.V., Shumenko, P.G. Cytochrome *b* as a more promising marker for analysing the distribution vector for *Metagonimus suifunensis* (Trematoda: Heterophyidae) // *Parasitology*. 2021. Vol. 148. P. 760-766.
122. Tatonova, Y.V., Shumenko, P.G., Besprozvannykh, V.V. Description of *Metagonimus pusillus* sp. nov. (Trematoda: Heterophyidae): phylogenetic

relationships within the genus // Journal of Helminthology. 2018. Vol. 92. P. 703-712.

123. Thaenkham, U., Blair, D., Nawa, Y., Waikagul, J. Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: are they distinct? // Parasitology International. 2012. Vol. 61. P. 90-93.

124. Thaenkham, U., Dekumyoy, P., Komalamisra, C., Sato, M., Dung, D.T., Waikagul J. Systematics of the subfamily Haplorchiinae (Trematoda: Heterophyidae), based on nuclear ribosomal DNA genes and ITS2 region // Parasitology International. 2010. Vol. 59. P. 460-465.

125. Thaenkham, U., Nawa, Y., Blair, D., Pakdee, W. Confirmation of the paraphyletic relationship between families Opisthorchiidae and Heterophyidae using small and large subunit ribosomal DNA sequences. Parasitology International. 2011. Vol. 60. P. 521-523.

126. Thaenkham, U., Phuphisut, O., Nuamtanong, S., Yoonuan, T., Sanguanthiat, S., Vonghachack, Y., Belizario, V.Y., Dung, D.T., Dekumyoy, P., Waikagul, J. Genetic differences among *Haplorchis taichui* populations in Indochina revealed by mitochondrial COX1 sequences // Journal of Helminthology. 2016. Vol. 91. P. 597-604.

127. Tkach, V.V., Littlewood, D.T.J., Olson, P.D., Kinsella, J.M., Swiderski, Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea) // Systematic Parasitology. 2003. Vol. 56. P. 1-15.

128. 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

129. 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 // Molecular Phylogenetic and Evolution. 1999. Vol. 12. P. 67-73.

130. Vilas, R. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites / R. Vilas, S.D. Criscione, M.S. Blouin // *Parasitology*. 2005. Vol. 131. P. 839-846.

131. Voronova, A.N., Chelomina, G.N., Besprozvannykh, V.V., Tkach, V.V. Genetic divergence of human pathogens *Nanophyetus* spp. (Trematoda: Troglotrematidae) on the opposite sides of the Pacific Rim // *Parasitology*. 2017. Vol. 144. P. 601-612.

132. Waeschenbach, A., Cox, C.J., Littlewood, D.T.J., Porter, J.S., Taylor, P.D. First molecular estimate of cyclostome bryozoan phylogeny confirms extensive homoplasy among skeletal characters used in traditional taxonomy // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. Vol. 52. P. 241-251.

133. Waikagul, J. Approaches to research on the systematic of fish-borne trematodes / J. Waikagul, U. Thaenkham – Academic Press, 2014. – 130 p.

134. Wootton, D.M. The life history of *Cryptocotyle concavum* (Creplin, 1825) Fischoeder, 1903 (Trematoda: Heterophyidae) // *Journal of Parasitology*. 1957. Vol. 43. P. 271-279.

135. Wright, S. Variability within and among natural populations In: *Evolution and the genetics of populations* / Chicago: . University of Chicago Press, 1978. Vol 4, 590p.

136. Yamada, S.M., Yamada, S., Takada, H., Hoshiai, Y.C. A case of metagonimiasis complicated with multiple intracerebral hemorrhages and diabetes mellitus // *Journal of Nippon Medical School*. 2008. Vol. 75. P. 32-35.

137. Yu, J.-R. Clonorchiasis and metagonimiasis in the inhabitants along Talchongang (river), Chungwon-gun / J.-R. Yu, S.-O. Kwon, S.-H. Lee // *Korean Journal of Parasitology*. 1994. Vol. 32. P. 267-269.

138. Yu, J.-R. Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus Miyata* type / J.-R. Yu, J.-S. Chung, J.-Y. Chai // *Korean Journal of Parasitology*. 1997. Vol. 35. P. 295-298.

139. Yu, J.-R. PCR-RFLP patterns of three kinds of *Metagonimus* in Korea / J.-R. Yu, J.-S. Chung, S. Huh, S.-H. Lee, J.-Y. Chai // Korean Journal of Parasitology. 1997. Vol. 35. P. 271-276.
140. Yu, S.H., Mott, K.E. Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections. Tropical Diseases Bulletin. 1994. Vol. 91. P 125-152.
141. Zarowiecki, M.Z., Huysse, T., Littlewood, D.T.J. Making the most of mitochondrial genomes – Markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea) // International Journal of Parasitology. 2007. Vol. 37. P. 1401-1418.
142. Zhang, D., Li, W.X., Zou, H., Wu, S.G., Li, M., Jakovlić, I., Zhang, J., Chen, R., Wang, G.T. Mitochondrial genomes of two diplectanids (Platyhelminthes: Monogenea) expose paraphyly of the order Dactylogyridea and extensive tRNA gene rearrangements // Parasite Vectors. 2018. Vol. 11, P. 601.
143. Zhao, G.H. ISSR, an effective molecular approach for studying genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different provinces in mainland China // Infection, Genetics and Evolution. 2009. Vol. 9. P. 903-907.
144. Zhao, G.H., Bian, Q.Q., Ren, W.X., Jia, Y.Q., Cheng, W.Y., Fang, Y.Q., Song, J.K., Lin, Q. Genetic variability among *Dicrocoelium dendriticum* isolates from different regions in Shanxi Province, China revealed by sequences of three mitochondrial genes // Mitochondrial DNA. 2013. Vol. 24. P. 683-688.
145. Zhigileva, O.N. Genetic variability and population differentiation of *Opisthorchis felineus* (Trematoda) in Western Siberian rivers / O.N. Zhigileva, D. V. Zenovkina, T. A. Zamyatina // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013. Vol. 3, P. 371-377.
146. Zhu, Y., Shen, J., Lei, G., Wang, Y. Environmental evolution of Xingkai (Khanka) Lake since 200 ka by OSL dating of sandhills // Geology. 2011. Vol. 56. P. 2604-2612.