

На правах рукописи

ВОРОНОВА
АНАСТАСИЯ НИКОЛАЕВНА

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

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Челомина Галина Николаевна**

Официальные оппоненты:

Щербаков Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией геносистематики

Туранов Сергей Викторович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной систематики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 4 » декабря 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovets-d-005-008-01/43-voronova-anastasiya-nikolaevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Вашенко

Вашенко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Нанофиедоз – опасное зоонозное заболевание, вызываемое трематодами из рода *Nanophyetus* Chapin, 1927 (Digenea: Troglotrementidae), передающееся через рыбу, распространённое в прибрежных регионах Тихого Океана: Соединенных Штатов Америки, Российского ДВ и Японии. В России нанофиедоз встречается чаще у жителей деревень и у коренных народностей Приамурья (Dragomeretskaia et al., 2014). Болезнь характеризуется явлениями энтерита, эозинофилией периферической крови, потерей веса (Harrel, Deardorff, 1990). В Северной Америке кишечные инфекции, вызванные *N. salmincola* были зарегистрированы в Орегоне, Вашингтоне и Калифорнии у людей, которые употребляли, недоваренный или домашнего копчения лосось (John, Petri, 2006). Заражение нанофиедозом может достигать 82% среди домашних плотоядных животных и 17,6% среди диких хищников (Dragomeretskaia et al., 2014). В Северной Америке нанофиедоз связывают с тяжелым системным заболеванием у собак, называемым «болезнью отравления лососем» (англ. salmon poisoning disease, SPD) и рыбьим гриппом (англ. fish flu) (Millemann, Knapp, 1970), причиной которых является бактерия *Neorickettsia helminthoeca*, использующая *N. salmincola* в качестве вектора (Vaughan et al., 2012). Без лечения антибиотиками болезнь обычно приводит к летальному исходу, а от рыбьего гриппа гибнут мальки лососевых рыб.

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

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

Филогенетические реконструкции класса Trematoda выполнялись главным образом на неполных геномных и спейсерных последовательностях рибосомного кластера более 15 лет назад на ограниченном числе видов и без

датировки дивергентных событий (Littlewood et al., 1999; 2001; Olson et al., 2003). Использование вторичных структур транскриптов рДНК, как дополнительного инструмента для анализа филогенетических связей представителей *Nanophyetus* и Trematoda в целом не применялось. В отличие от моногеной (Matejuszova 2004) и цестод (Zhang et al., 2010, 2017), попыток моделирования варибельных участков 18S рРНК трематод не предпринималось. Исследование внутривидовой генетической изменчивости было проведено только для *N. salmincola* с помощью одного молекулярного маркера – последовательности гена *nad1* мтДНК (Criscione, Blouin, 2004). Филогеография и демографические истории видов *Nanophyetus* прежде не изучались. Вторичные и третичные структуры каких-либо белковых молекул для видов *Nanophyetus* не моделировались.

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

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить полноразмерные последовательности генов (18S, 5,8S и 28S) и спейсеров (ITS1 и ITS2) рибосомного кластера (рДНК) и последовательности гена *nad1* митохондриальной ДНК (мтДНК) представителей *Nanophyetus* из разных географических регионов;

2. Оценить генетическое разнообразие региональных и локальных (из разных речных систем и разных видов рыб-хозяев) популяций *Nanophyetus* по данным нуклеотидной изменчивости маркеров ядерной рДНК и мтДНК;

3. Провести историко-демографический анализ региональных и локальных популяций *Nanophyetus* на основе данных генетического полиморфизма гена *nad1* мтДНК;

4. С учетом данных из GenBank реконструировать филогенетические связи представителей *Nanophyetus* на разных таксономических уровнях с оценкой времени дивергенции основных филогенетических линий;

5. Смоделировать вторичные структуры транскриптов ITS1, ITS2 и варибельных участков 18S рДНК представителей *Nanophyetus* с локализацией на них консервативных (структурных и функциональных) мотивов;

6. Основываясь на данных генных последовательностей смоделировать вторичную и третичную структуры первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi*;

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

Научная новизна. В диссертационной работе впервые детально изучаются особенности организации генетического разнообразия трех видов

трематод рода *Nanophyetus* (*N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*) на основе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генов (18S, 5.8S и 28S) и спейсерных (ITS1 и ITS2) участков рДНК, частичной и полной последовательности гена мтДНК (*nad1*), кодирующего первую субъединицу NADH-дегидрогеназы, а также вторичных структур переменных участков 18S рРНК и транскриптов ITS спейсеров рДНК. Впервые для трематод реконструированы схемы вторичной и третичной структур прогнозируемого белка NADH1 дегидрогеназы, а также вторичных структур 9 переменных участков 18S рРНК для 65 видов отряда Plagiorchiida. Установлены филогенетические связи видов *Nanophyetus* на разных таксономических уровнях с датировкой дивергентных событий. Впервые для представителей рода *Nanophyetus* реконструированы демографические истории региональных (видовых) и локальных географических популяций, а также популяционных выборок из различных видов рыб-хозяев. Установлены последовательность и время формирования основных эволюционных линий *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, получены генетические свидетельства их видовой самостоятельности.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты настоящей работы, полученные с помощью современных методов анализа молекулярно-генетических данных, вносят существенный вклад в исследование генетического разнообразия трематод в целом и представителей рода *Nanophyetus* в частности, их филогении и филогеографии, а также паразито-хозяйных отношений. Во время исследования определены и депонированы в международную базу данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) 60 новых нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК и 73 последовательности генов и спейсеров рДНК. Полученные результаты важны для прогнозирования эпидемиологической ситуации на Дальнем Востоке России, практического применения в сельском хозяйстве и медицинских исследованиях, включая развитие молекулярной диагностики и создание противогельминтных препаратов нового поколения.

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

Методология и методы диссертационного исследования. В данной диссертационной работе применены методы классической паразитологии и современные методы молекулярной генетики и биоинформатики. Амплификацию выбранных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР. Получение нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера. Анализ данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения и статистических программ. Филогенетические

древа реконструированы с использованием метода максимального правдоподобия (ML), метода объединения ближайших соседей (NJ) и байесовского вывода (BI) в программах MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) и MrBayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Возможные варианты мутационных переходов между гаплотипами мтДНК рассчитаны и визуализированы с помощью метода медианных сетей (median joining) (Bandelt et al, 1999). Молекулярная датировка возникновения основных филогенетических линий у исследованных таксонов проведена на основе байесовского подхода в пакете программ BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Для реконструкции демографической истории популяций задействованы методы коалесцентного анализа. Вторичные структуры транскриптов рДНК моделировали в программах RNAalifold (Bernhart et al., 2008), RNAfold и Mfold 3.0 (Zuker, 2003). Выполнен поиск консервативных, теломерных и регуляторных мотивов. Для моделирования вторичных и третичных структур первой субъединицы NADH-дегидрогеназы использовали программу, доступную на портале PHYRE2 (Kelley et al., 2015).

Личный вклад автора. Экспериментальная часть молекулярно-генетических исследований и обработка данных были выполнены автором в полном объеме. Самостоятельно освоены различные программы для филогенетического анализа данных в рамках исследования. Автор принимала участие в получении паразитологического материала, представлении результатов исследования на конференциях и в подготовке материалов для публикаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена современными молекулярно-генетическими, филогенетическими и филогеографическими подходами, включая методы коалесценции и статистической обработки данных, а также методами биоинформатики, которые соответствуют целям и задачам, поставленным в работе. Использование одних и тех же алгоритмов и методов анализа с помощью

разного программного обеспечения, а также повтор результатов при дополнительных экспериментах и достаточный объём выборки позволили всесторонне проанализировать полученные данные и определили точность реконструкций демографических и дивергентных событий. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы подкреплены данными, приведенными в таблицах, рисунках, диаграммах, гистограммах, и моделями вторичных структур.

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

Публикации. По результатам исследования опубликовано 7 научных работ: 3 – статьи в рецензируемом издании, рекомендованном действующим списком ВАК, 4 – тезисы научных конференций.

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой подглаве описывается морфология, а также приводятся данные о географическом распространении, биологических, экологических особенностях, патогенности и таксономическом положении исследуемых видов *Nanophyetus*. В следующей подглаве рассказывается об использовании маркёров ядерной ДНК, в частности генов и спейсеров рибосомного кластера, для молекулярно-генетических исследований трематод с примерами и акцентом на современные достижения в области систематики отряда Plagiorchiida La Rue, 1957. В третьей подглаве перечислены преимущества использования маркеров мтДНК по сравнению с ядерными для изучения внутри- и межвидовой генетической изменчивости трематод. Показано, что гены *cox1* и *nad1* являются хорошими маркерами для популяционно-генетического анализа. Дано описание имеющейся концепции филогеографии и перечислены основные тенденции развития в данной области. В заключительной подглаве изложены принципы, на которых базируется моделирование вторичных структур генов и спейсеров рибосомной РНК и реконструирование трехмерных моделей белковых молекул. Описывается потенциал их использования в различных областях от систематики до медицины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение паразитологического материала. Материалом для исследования послужили выборки *Nanophyetus* spp. трёх региональных популяций: российского Дальнего Востока, Японских островов и Северной Америки, представленных *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно. Образцы *Nanophyetus schikhobalowi* были получены из четырёх локалитетов; точки сбора в Приморском крае находились в Ханкайском районе, реки Комиссаровка и Илистая; Уссурийском районном округе, река Комаровка; Чугуевском районе, река Павловка. Взрослых особей трематод (мариты) *N. schikhobalowi* получали экспериментальным путем в лаборатории ФНЦ биоразнообразия РАН. Часть образцов *N. schikhobalowi* была любезно предоставлена В.В. Беспрозванных, метацеркарии и мариты *N. japonensis* – Я. Араки, Х. Кино и Т. Шимадзу. Экземпляры *N. salmincola* получены В.В. Ткачем из лососевых рыб в штате Орегон (США). Для молекулярно-генетического анализа использовано 77 образцов *Nanophyetus* spp.

2.2. Выделение геномной ДНК. Для выделения геномной ДНК использовали метод HotSHOT (Truett et al., 2000).

2.3. Амплификация ДНК. Для амплификации полноразмерных генов рибосомного кластера *Nanophyetus* spp. (18S и 28S), ITS1-5,8S-ITS2 региона

ядерной рибосомной ДНК, а также гена *nad1* мтДНК частичных и полных последовательностей были использованы специально разработанные и универсальные для большинства трематод праймеры.

2.4. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Секвенирование фрагментов осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по методике производителя на секвенаторе ABI PRIZM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) на базе ЦКП ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

2.5. Редактирование и выравнивание последовательностей. Полученные нуклеотидные последовательности собирали и визуально проверяли на наличие ошибок по хроматограммам с помощью SnapGene Viewer 3.2.1 (SnapGene software, GSL Biotech, snapgene.com). Анализ, редактирование и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Поиск консервативных, регуляторных и теломерных повторов в первичных нуклеотидных последовательностях ITS-участков проводили визуально.

2.6. Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ: MEGA 7 (Kumar et al., 2016), DnaSP ver. 5.10 (Librado, Rozas, 2009), BIOEDIT 7.1.9 (Hall, 1999), ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier et al., 2005). Проверка гипотезы об изоляции популяций расстоянием была проведена с помощью теста Мантела в программе IBD 1.52 for Windows (Isolation by Distance) (Bohonak, 2002).

2.7. Реконструкция демографической истории популяций. Демографический анализ популяционных выборок был проведен в программе ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005). Проверка селективной нейтральности наблюдаемого ДНК-полиморфизма осуществлялась с помощью стандартных тестов: Tajima's D (Tajima, 1989) и Fu's Fs (Fu, 1997). Наличие или отсутствие популяционной экспансии подтверждали характером распределения попарных генетических различий гаплотипов (mismatch-distribution) в DnaSP ver. 5.10 (Librado, Rozas, 2009). Для расчета времени возможных демографических экспансий получали значения временного коэффициента τ и переводили их в абсолютное время в миллионах лет (t) по формуле: $\tau=2ut$, где u – скорость мутации, а t – время дивергенции в поколениях.

Байесовские контурные диаграммы (Bayesian skyline plot) для популяций исследуемых видов были построены с помощью программ пакета BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2005). В модуле BEAUti было задано значение скорости эволюции для гена *nad1* равное 2,8% за 1 млн лет. Данные независимых симуляций были объединены и визуализированы в программе TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2013).

2.8. Моделирование вторичных структур транскриптов рДНК.

Для построения вторичных структур транскриптов ITS1, ITS2 рДНК и переменных участков 18S рРНК *Nanophyetus* spp. и других представителей трематод использовали алгоритмы динамического программирования и метод минимально-энергетических состояний Цукера, реализованные в программах RNAalifold, RNAfold (Bernhart et al., 2008) и Mfold ver. 3.0 (Zuker, 2003). Структуры отбирали в соответствии с универсальным принципом минимизации свободной энергии DG, где DG – количество энергии, необходимое для образования вторичных структур.

2.9. Определение предполагаемой структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы. 2D и 3D модели белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы реконструировали в программе доступной на портале PHYRE2 (Kelley et al., 2015). Для прогнозирования сайтов связывания с лигандами использовали программу 3DLigandStie (Wass et al., 2010).

2.10. Филогенетический анализ. Для получения филогенетических реконструкций применяли следующие программы: Modeltest ver. 3.07 (Posada, Crandall, 1998), MEGA 7 (Kumar et al., 2016), Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Медианные сети риботипов *Nanophyetus* spp. были сконструированы с использованием алгоритма median joining в Network 5.0 (Bandelt et al., 1999). Для реконструкции внутри- и межвидовых филогенетических связей между гаплотипами гена *nad1* были построены деревья MST (Excoffier et al., 2005).

2.11. Датировка дивергентных событий. Время дивергенции *Nanophyetus* spp. и рыб-хозяев было установлено с помощью байесовского подхода в пакете программ BEAST (1.8.2) (Drummond et al., 2012). Время обнаружения яиц трематод в копролитах раннемеловых архозавров было взято за основную калибровочную точку (примерно 125,93 млн.л.н.) (Poinar, Boucot, 2016). Байесовские филогенетические деревья суммировали в программе TreeAnnotator (пакет BEAST 1.8.2), используя алгоритм maximum clade credibility (MCC), и визуализировали с помощью программы FigTree 1.3 (Rambaut, 2014).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ рибосомного кластера. Определены полноразмерные нуклеотидные последовательности генов 18S рРНК и 28S рРНК для 8 образцов *Nanophyetus schikhobalowi* и *N. japonensis*, а также 61 полноразмерная нуклеотидная последовательность региона ITS1-5,8S-ITS2 рДНК для трёх видов. Общая длина анализируемых участков рДНК составила 7082 п.н., 7107 п.н. и 4298 п.н. для *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно.

Нуклеотидные последовательности ДНК

18S рДНК. Полный размер 18S рДНК для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* составил 1980 п.н. Последовательности 18S рДНК для *N. salmincola*, взятые из GenBank, были короче на 187 п.н. – 1793 п.н. Дивергенция по маркеру 18S рДНК между *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* составила 0,05%, между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* – 0,17%, а между *N. japonensis* и *N. salmincola* – 0,22%.

28S рДНК. Полноразмерные последовательности гена 28S рРНК для *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* составили 3885 п.н. При сравнении выровненных по самому короткому участку *N. salmincola* (данные GenBank) 1321 п.н. последовательностей гена 28S рРНК дивергенция между *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* составила 0,5%, между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* – 0,07%, а между *N. japonensis* и *N. salmincola* – 0,6%.

ITS1-5,8S-ITS2 рДНК. За счёт инделей (около 17% длины ITS1) размер участка варьировал и составил 772 п.н., 791 п.н. и 739 п.н. для *N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola* соответственно.

Последовательности ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. schikhobalowi* отличались между собой 9 нуклеотидными заменами ($d=0,7\%$), *N. japonensis* – по 3 нуклеотидам ($d=0,1-0,2\%$), а последовательности *N. salmincola* оказались идентичными. Распределение нуклеотидных замен в последовательностях было специфично для каждого вида, а также локальных популяций *N. schikhobalowi* из разных рек и разных видов рыб-хозяев.

Генетическое расстояние между последовательностями ITS1-5,8S-ITS2 рДНК *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* составило 13,3%, между *N. salmincola* и *N. japonensis* – 12%, а между *N. japonensis* и *N. schikhobalowi* – 2,6%. *Fst*-статистика выявила высокую генетическую подразделенность между географическими регионами, представленными разными видами ($Fst=0,966-0,995$, $P<0,05$), и низкую статистически не подтвержденную дифференциацию между локальными популяциями *N. schikhobalowi*, за исключением Комаровки при сравнении с Павловкой ($Fst=0,687$, $P<0,05$). Интересно, что между выборками из ленков и гольянов обнаружена небольшая, но статистически значимая генетическая дифференциация. В полной выборке для полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК идентифицировано 16 риботипов, общих для видов *Nanophyetus* не найдено (Рис. 1). Риботипическое, как и нуклеотидное разнообразие, нанофиетусов, извлеченных из карповых рыб, было значительно выше, особенно тех образцов, чьими хозяевами являются гольяны, выловленные в Илстой. Риботипы R1 и R2 встречаются у нанофиетусов, хозяевами которых являются как лососёвые, так и карповые рыбы, в соотношении 81,2% и 12,6%, и 15,5% и 30,7% соответственно. Были выделены хозяиноспецифичные риботипы: R6 и R9 для выборки из ленков и R3, R4, R5, R7, R8 и R10 для выборки из гольянов.

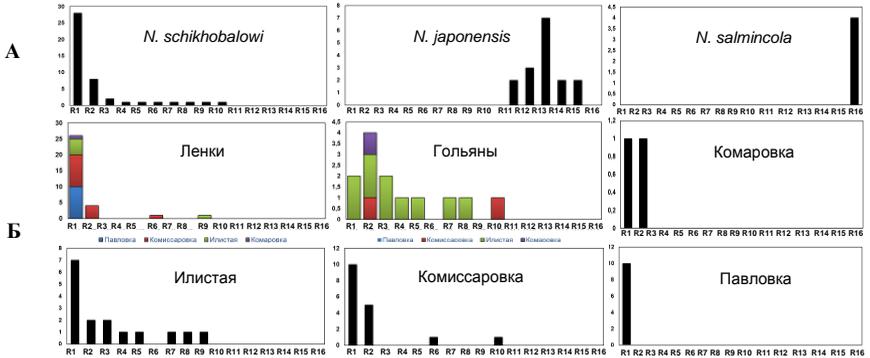
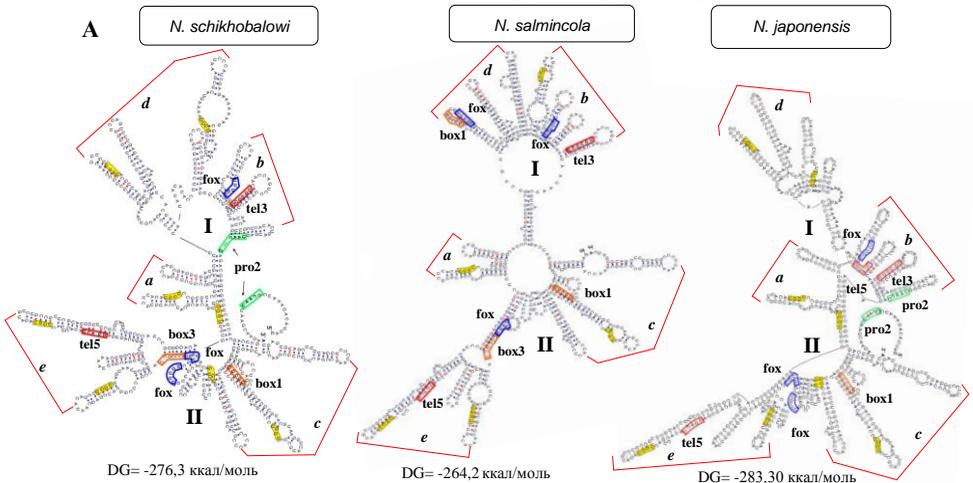


Рисунок 1 – Частоты риботипов полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК для видов *Nanophyetus* (А) и разных локалитетов и хозяев *N. schikhobalowi* (Б). Ось x – номер риботипа, ось y – количество нуклеотидных последовательностей в риботипе.

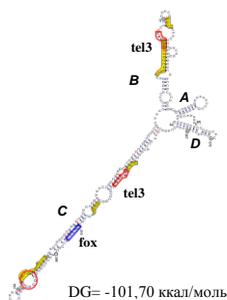
MJ-сеть объединяет риботипы *N. schikhobalowi*, *N. japonensis*, *N. salmincola* в отдельные удаленные друг от друга кластеры, которые соединены между собой через три гипотетических риботипа. Предковым для *N. japonensis* и *N. schikhobalowi*, а также отдельно для нанофиетусов, выделенных из ленков и гольянов являются мажорные риботипы R13 и R1, находящиеся в центре звёздчатых структур.

Вторичные структуры транскриптов спейсерных участков рДНК

Вторичные структуры ITS1 имеют сложную древовидную конформацию, где отчётливо выделяются две ветви (I и II), с различным числом шпилек, формирующих пять структурных элементов («a–e») разной степени вариабельности, и отделенные друг от друга спиралью (Рис. 2А).



Б



13

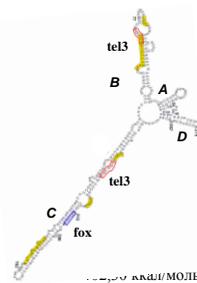
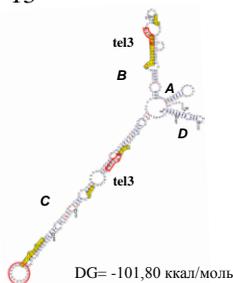


Рисунок 2 – Вторичные структуры ITS1 (А) и ITS2 (Б), смоделированные *de novo* в программе RNAalifold с локализованными специфичными (в желтых прямоугольниках), регуляторными (промоторные – в зеленых, fox – синих рамках) и теломерными (в красных рамках) мотивами. Канонические связи между нуклеотидами обозначены синей точкой, неканонические – красной.

Наиболее примечательное отличие вторичных структур ITS1 *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* от *N. salmincola* – это присутствие двух шпилек средней длины (элемент «а») в этой спирали. У *N. salmincola* эти шпильки имеют смещенную локализацию и включены в ветвь II. Как в ITS1, так и в ITS2 существуют межвидовые отличия по количеству и локализации регуляторных и теломерных мотивов (Рис. 2Б). Модели вторичной структуры ITS2 *Nanophyetus* spp. разделяли типичный для эукариот паттерн укладки, т.е. ладонь с четырьмя пальцами. На вторичных структурах ITS1 и ITS2 нанофетусов были локализованы общие для эукариот 5'-UGGU-3' (Schultz et al., 2005; Ghatani et al., 2012; Coleman et al., 2015) и специфичные для трематод 5'-GAGUCGUGGCUCA-3'; 5'-GGGUGCCAGAUC-3' (Morgan, Blair, 1998) консервативные мотивы.

Вторичные структуры переменных участков 18S рРНК

Были смоделированы вторичные структуры пяти наиболее переменных доменов (ES3^S, ES6^S, ES7^S, ES9^S, ES12^S) и четырех присоединенных к ним спиралей (h26, h39, h44) 18S рРНК для 45 видов из 14 семейств (включая Troglotrematidae) трематод отряда Plagiorchiida.

Структура ES3^S имеет сложную конформацию, состоит из двух шпилек, ES3a и ES3c, и спирали ES3b, соединяющей крупную внутреннюю петлю и ES3c с остальной частью молекулы. Были выделены три варианта укладки ES3^S. В состав самого обширного домена ES6^S входит 5 переменных шпилек (субдоменов): ES6a, ES6b, ES6c1, ES6c2, ES6d. У разных видов дигеней субдомены имеют единый план строения, но конформационно отличаются друг от друга наличием внутренних и выпуклых петель внутри тела шпилек и различным числом нуклеотидов, входящих в состав булавочных головок. Эти структурные особенности являются уникальной чертой того или иного семейства. В целом выявлено 15 вариантов укладки домена ES6^S. ES7^S – переменный участок с наименьшим размером. Спираль 26, соединенная с ES7^S, содержит фиксированное число нуклеотидов – 20;

внутри h26 неизменно локализуется одна внутренняя петля. Выявлено 4 варианта укладки домена ES7^S-h26. ES9^S стабильно отделяются от h39 внутренней петлей из четырех или восьми нуклеотидов. Было получено 10 вариантов укладки вторичных структур h39-ES9^S. ES12^S является наиболее консервативным участком, соединяющимся со спиралью h44. Конформация h44 сходна для всех исследуемых трематод, имеет вид шпильки с двумя внутренними петлями, включает 3 внутренних петли, и через последнюю переходит в шпильку ES12^S. Выявлено 2 варианта укладки вторичных структур домена h44-ES12^S.

Следует отметить, что домены гораздо более изменчивы по сравнению со спиральями. Спирали h16 и h17 заканчиваются небольшими булавочными головками; со стороны 5'-концов образуются протяженные внешние петли. Спирали h41 отличаются друг от друга размером, конформацией и локализацией внутренних петель; всего получено 6 вариантов укладки. У видов *Nanophyetus* spp. замены локализовались в основном в доменах. Длина спиралей варьировала от 35 (h16) до 62 п.н. (h41). Доля собственно спиральных участков составляла от 28% (h17) до 70% (h41). Общий GC-состав – около 40%; GC содержание в спиральных участках варьировало от 30-60%, а в петлях было в пределах 25-40%.

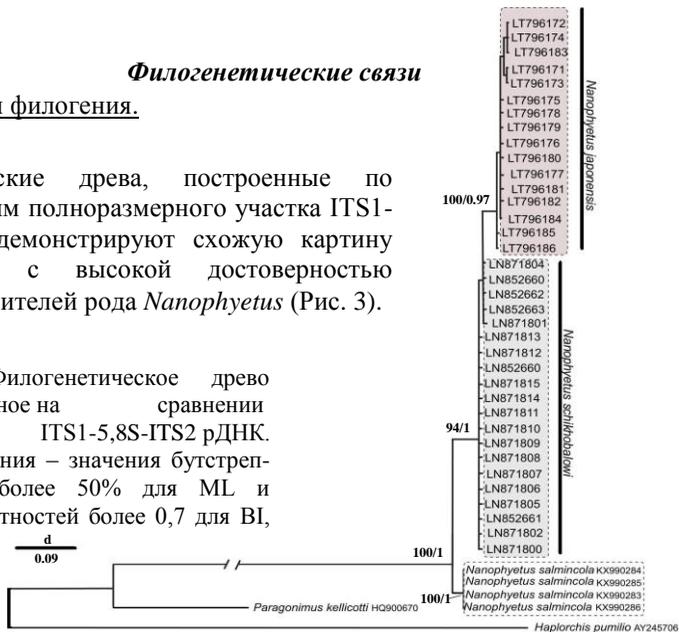
В целом, вариабельные домены 18S рРНК трематод обнаружили ряд структурных особенностей: крестообразная форма ES6b (1), наличие дополнительной укороченной спирали ES6c (2), удлинённые спирали ES6a (3) и h39+ES9^S (4).

Филогенетические связи

Внутриродовая филогения.

Филогенетические деревья, построенные по последовательностям полноразмерного участка ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, демонстрируют схожую картину кластеризации и с высокой достоверностью разделяют представителей рода *Nanophyetus* (Рис. 3).

Рисунок 3 – Филогенетическое древо *Nanophyetus*, основанное на сравнении последовательностей ITS1-5,8S-ITS2 рДНК. Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI,



Филогения подотряда Xiphidiata. Впервые для подотряда Xiphidiata реконструировано филогенетическое древо на основании сравнения 78 последовательностей почти полноразмерного гена 18S рРНК (~90% длины гена). Последовательно дифференцирующиеся надсемейства Alloscreadioidea, Harporoidea и Gorgoderoidea, можно объединить в общую кладу по отношению к которой субклада надсемейства Plagiorchioidea является сестринской. Для разрешения филогенетических связей между семействами внутри Gorgoderoidea отдельно построено древо на основании сравнения 28 последовательностей гена 18S рРНК (>95% длины гена). Монофилетичность надсемейства Gorgoderoidea имеет надёжную статистическую поддержку (89% бутстреп-поддержки для ML и 0,98 апостериорных вероятностей для BI). Семейство Troglotrematidae, включающее рода *Nanophyetus* и *Nephrotrema*, тесно кластеризуется с Paragonimidae с максимальной статистической поддержкой.

Хронограммы. Впервые с помощью программы BEAST произведена временная оценка дивергенции основных филогенетических линий трематод отряда Plagiorchiida (включающего *Nanophyetus* spp.). Для реконструкции филогенетического древа использовали только полноразмерные последовательности гена 18S рРНК эпидемиологически значимых видов, полученные нами и доступные в GenBank. Для определения экологического вектора эволюции на дендрограмме проиллюстрирована специфичность дигенетических сосальщиков по отношению к промежуточным и окончательным хозяевам (Рис. 4). Виды первой клады в качестве первых и вторых промежуточных хозяев используют преимущественно моллюсков, в то время как виды из второй клады, предпочитают рыб в качестве второго промежуточного хозяина.

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

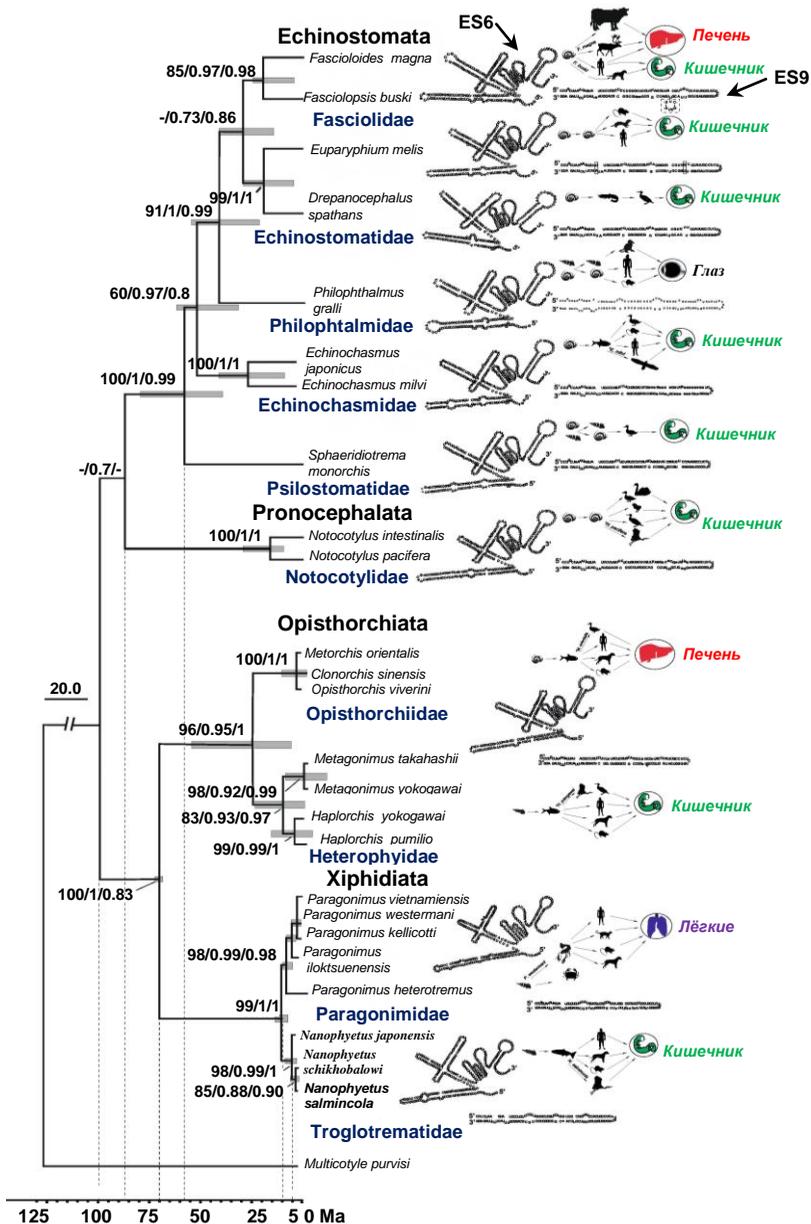


Рисунок 4 – Филогенетическое древо Trematoda с вычислением времени дивергенции (Ma – млн. лет), основанное на сравнении последовательностей гена 18S рРНК. Числа в узлах ветвления – значения бутстреп-поддержки ветвей более 50% для ML и апостериорных вероятностей более 0,7 для BI, показано (ML/BI/BEAST); серые прямоугольники – 95% интервалы наивысшей апостериорной плотности оценок времени существования клад. Отражены жизненные циклы и высоко варибельные вторичные структуры доменов ES6^S и ES9^S, специфичные для разных семейств трематод. Виды рода *Nanophyetus* выделены жирным шрифтом.

3.2. Анализ гена *nad1* мтДНК.

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена

Общая характеристика. Общий набор данных по *nad1* включал 151 неполную последовательность длиной 621 п.н., 60 из которых были получены в данной работе и 91 последовательность взяли из GenBank (Criscione, Blouin, 2004). Характер распределения нуклеотидных замен регион-специфичен. Нуклеотидная изменчивость *nad1* последовательностей в выборках из разных рек и из разных видов рыб-хозяев *N. schikhobalowi* также отличается. Для *nad1* нанофиетусов из гольянов характерны несколько инвариабельных зон, общей протяженностью примерно 200 п.н. Инвариабельные зоны *nad1* нанофиетусов из гольянов соответствуют зонам пониженной изменчивости нанофиетусов из ленков, за исключением самой ближней к 3'-концу, которая у выборки из ленков, в противоположность гольянам, высоко изменчива. Интересно, что именно в этой зоне (580–590 п.н.) при сравнении нанофиетусов из ленков разных речных бассейнов наблюдается возникновение высокого пика, означающего ярко выраженную изменчивость.

Попарные генетические расстояния внутри региональных выборок оценивались как относительно низкие: $d=0,2-1,4\%$ ($d_{cp}=0,8\%$), $d=0,3-3,2\%$ ($d_{cp}=1,6\%$) и $d=0,3-2,1\%$ ($d_{cp}=1,2\%$) для *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis* соответственно. Отмечены высокие значения индексов генетической изменчивости для каждого вида, хотя нуклеотидная изменчивость для *N. salmincola* ($\pi=0,00814\pm 0,00046$) несколько ниже, чем для образцов *N. schikhobalowi* ($\pi=0,01568\pm 0,00080$) и *N. japonensis* ($\pi=0,01214\pm 0,00081$).

При сравнении последовательностей *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*, *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*, а также *N. japonensis* и *N. salmincola* было обнаружено 169, 119 и 151 вариабельных сайтов соответственно. Последовательности гена *nad1* в объединенной выборке ($n=151$) отличаются 190 нуклеотидами (155 информативны для парсимонии), которые приводят к 52 (из 207) аминокислотным заменам, из них фиксированные: 9 при сравнении *N. salmincola* и *N. schikhobalowi*, 13 – *N. salmincola* и *N. japonensis*, и 6 – *N. schikhobalowi* и *N. japonensis*.

Аминокислотный состав первой субъединицы NADH-дегидрогеназы у трех разных представителей *Nanophyetus* очень похож и включает около 1% отрицательно заряженных аминокислот, 16% ароматических, 20% полярных (гидрофильных незаряженных) и 60% неполярных (гидрофобных) аминокислот. В ряде случаев наблюдаются фиксированные отличия в кодировании аминокислот. Так, триплеты AAC, CAG и CCA, кодирующие аспарагин, глутамин и пролин соответственно, используются только *N. japonensis*; триплеты CCG и CAU, кодирующие пролин и гистидин – *N. salmincola*, GAA и GCA, кодирующие глутаминовую кислоту и аланин

встречаются как у *N. schikhobalowi*, так и *N. salmincola*, а AUC кодирует изолейцин только у *N. salmincola* и *N. japonensis*. Наиболее часто встречаются кодоны фенилаланина и лейцина.

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

В объединенной выборке идентифицировано 130 гаплотипов, общих для видов не найдено. Для локальных выборок трематод из рек Комиссаровка, Илистая и Павловка выделено 22, 9 и 10 уникальных гаплотипов соответственно. Стоит отметить, что почти все гаплотипы являются хозяиноспецифичными: Н78-Н79, Н85-Н101, Н104-Н117 для ленков, а Н77, Н80-Н84, Н103 – для голянов. Н102 – единственный общий гаплотип для всех локальных популяций *N. schikhobalowi*.

Внутриродовая филогения. Филогенетические деревья, построенные как по данным гена *nad1* мтДНК, так и основанные на аминокислотных последовательностях, являются хорошо разрешенным, с высокими индексами бутстреп поддержки для каждого вида *Nanophyetus*.

Генетическая структура и популяционная история. *Fst*-статистика выявила низкую генетическую подразделенность между локальными выборками *N. schikhobalowi* ($Fst=0,01328-0,32880$, $P<0,0001$) и высокую – между географическими регионами ($Fst=0,8562-0,9462$, $P<0,0001$), подтверждающую практически полное прекращение генных потоков между видами. Однако, между популяциями нанофитетусов из ленков и голянов, и рек Комиссаровка и Илистая, впадающих в озеро Ханка, генные потоки сохраняются и поддерживаются на высоком уровне.

Генеалогическое минимальное спенинговое древо (MST) на основе неполных последовательностей гена *nad1* мтДНК (Рис. 5) показало, что гаплотипы группируются в соответствии с видовой принадлежностью, образуя протяжённую гаплотипическую сеть. Гаплотипы *N. salmincola* формируют компактную, но сложную конфигурацию с центральной и несколькими периферическими звёздчатыми структурами, предположительно предковыми для которых являются гаплотипы Н5 и Н2, Н56, Н58, Н30 соответственно. Примечательно, что в центре гаплотипической сети находятся гаплотипы *N. schikhobalowi*, соединённые как с *N. salmincola* через гаплотип Н81 (река Илистая – бассейн озера Ханка), так и с *N. japonensis* через гаплотип Н113 (река Павловка – бассейн реки Усури). В сети гаплотипов *N. schikhobalowi* можно выделить три основные филогруппы: *L1* – центральная звёздчатая структура (предковый гаплотип Н82, р. Илистая), *L2* – периферическая звёздчатая структура, образованная

только гаплотипами из Павловки (предковый гаплотип H113, р. Павловка), и L3, дивергировавшая от центральной структуры ветвь гаплотипов, включающая единственный общий для локальных популяций *N. schikhobalowi* гаплотип H102 (р. Илистая, Комиссаровка). Связующие гаплотипы H81 и H82, принадлежат нанофиетусам выделенным из карповых рыб, H113 – лососёвых, а H102 является единственным гаплотипом, общим для трематод из лососёвых и карповых видов рыб-хозяев. MJ-сеть для последовательностей гена *nad1* мтДНК в общем виде имеет сходство с MST. Сети демонстрируют слабо выраженную внутреннюю структурированность региональных популяций, где практически все группировки, так или иначе, оказываются связанными гипотетическими гаплотипами.

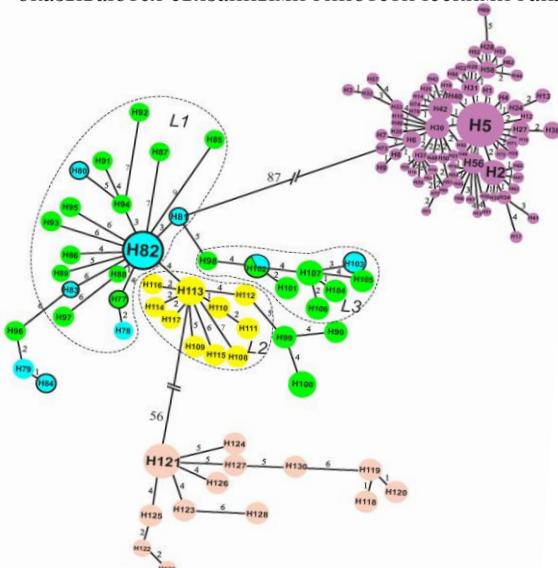


Рисунок 5 – MST-дерево для гаплотипов гена *nad1* мтДНК *Nanophyetus*.

Длина ветвей пропорциональна количеству нуклеотидных замен. Гаплотипы *N. salmincola* и *N. japonensis* обозначены фиолетовым и розовым цветом соответственно. Гаплотипы *N. schikhobalowi* из Комиссаровки окрашены в зелёный цвет, Илестой – синий, Павловки – жёлтый. Гаплотипы образцов, выделенных из гольянов обведены чёрными кругами, из ленков – без контура.

Размер круга пропорционален числу отходящих от него связей.

Анализ распределения попарных генетических отличий (mismatch distribution) показал унимодальное распределение с высокой статистической поддержкой для *N. schikhobalowi* (в том числе локальных популяций и популяций *N. schikhobalowi* из разных видов рыб-хозяев), *N. salmincola* и более низкой для *N. japonensis*. Результаты Fu's F_s теста на селективную нейтральность показали высокие, достоверно отрицательные значения для нанофиетусов из всех географических регионов (т.е. видов) и локальных популяций, за исключением филогруппы L3. Для установления времени популяционной экспансии мы использовали данные Этвуда с соавторами (Attwood et al., 2008), согласно которым скорость нуклеотидных замен равна 2,5% на млн. лет для частичной последовательности гена *cox1* *Schistosoma mansoni*, а в перерасчете для гена *nad1* – 2,8% (т.е. $8,96 \cdot 10^{-6}$ замен/сайт/год)

и время жизни поколения равное 1 году. Демографическая экспансия нанофиетусов происходила 195–380 тыс. лет назад, сразу после пространственной экспансии, имевшей место 280 – 500 тыс. лет назад, в одной и той же последовательности *N. schikhobalowi* → *N. japonensis* → *N. salmincola*.

Временные оценки демографического роста для локальных популяций и выборки *N. schikhobalowi* из различных видов рыб-хозяев отличались. Датировки событий популяционной экспансии, происходившей в локальных популяциях рек Комаровка и Илистая (бассейн оз. Ханка), намного превышали таковые для локальной популяции из р. Павловка (бассейн р. Усури). Пространственная экспансия для выборки из разных видов рыб-хозяев датируется одним временем, однако демографическая экспансия выборки из ленков (лососевые) значительно опережала таковую для голянов (карповые).

На построенных в BEAST древах, для одновременной оценки времени дивергенции рыб и трематод, показано, что виды *Nanophyetus* сформировались почти одновременно (примерно 2–5 млн. лет назад) со своими основными промежуточными хозяевами (меньше 10 млн.л.н.).

Анализ байесовских контурных диаграмм со средним и медианным значением N_eT наряду с видоспецифическими особенностями демонстрирует наличие общего тренда развития популяций нанофиетусов (Рис. 6). Наблюдается повышение эффективной численности, находящейся в отрицательном диапазоне.

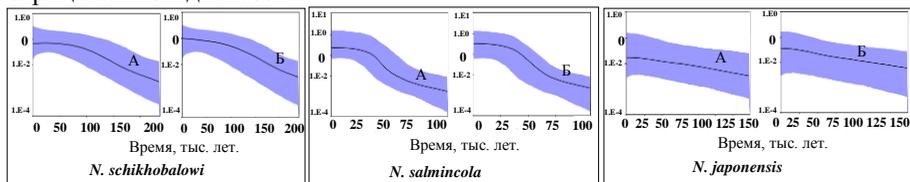


Рисунок 6 – Байесовские контурные диаграммы, построенные для неполных последовательностей мтДНК *Nanophyetus*. График показывает изменение показателя N_eT (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее (Б) показателя N_eT , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной

Характеристика полноразмерного гена *nad1* *N. schikhobalowi*

В настоящей работе была определена полноразмерная последовательность гена *nad1*, кодирующего первую субъединицу NADH-дегидрогеназного комплекса *N. schikhobalowi* длиной 897 п.н.

Модель белка NADH1 *N. schikhobalowi*. Впервые для трематод были получены трёхмерные и двухмерная модели первой субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса I (Рис. 7). 288 аминокислотных остатков (96% последовательности) были смоделированы с достоверностью 100,0% и с

30%-сходством с молекулой NADH млекопитающих. 82% белка составляют альфа спирали, 65% – трансмембранные спирали; бетта-складчатого слоя не обнаружено. Прогнозируемый сайт связывания молекулы первой субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса *N. schikhobalowi* образован семью аминокислотными остатками (LEU – 189, CYS – 190, GLU – 191, CYS – 192, ASN – 193, ASP – 198, 199 – TYR) (Рисунок 14Б).

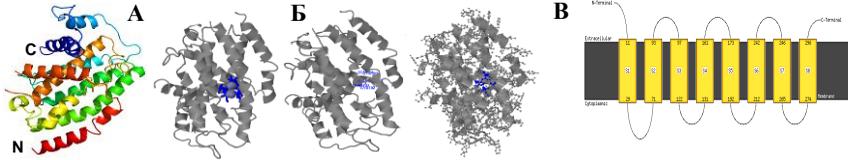


Рисунок 7 – Трёхмерные (А, Б) и двумерная (В) модели первой субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса *N. schikhobalowi*. Сайт связывания (аминокислотные остатки окрашенные синим) отображены в нескольких вариантах визуализации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Особенности распределения генетического разнообразия внутри и между видами рода *Nanophyetus*. В настоящей работе с помощью молекулярных маркеров яДНК и мтДНК мы показали, что уровни дивергенции между региональными популяциями *Nanophyetus* spp. соответствуют уровням межвидовой дифференциации, наблюдаемой в различных таксонах трематод (например, Morgan, Blair, 1995; Chen et al., 2007; Snyder, Tkach, 2011; Curran et al., 2013; Kasl et al., 2014; Bazsalovicsova et al., 2015). Эти данные в совокупности с отсутствием общих рибо- и гаплотипов, свидетельствующим о полном завершении сортировки митохондриальных линий, высокими значениями генных фиксации, отражающими практически полное прекращение генных потоков, а также филогенетическими реконструкциями, с высокой статистической поддержкой группирующими в отдельные монофилетические клады представителей *N. salmincola*, *N. japonensis* и *N. schikhobalowi*, а также в соответствии с ранее опубликованными морфологическими различиями, дают основания для восстановления валидности *N. schikhobalowi* как самостоятельного вида и подтверждения видового статуса *N. japonensis* и *N. salmincola*.

Анализ распределения внутривидового генетического разнообразия *N. schikhobalowi* выявил два типа изменчивости: географическую и хозяиноспецифическую. Нашим данным по географической изменчивости соответствует модель с изолированными группами (Vohonak, 2002). Наличие хозяиноспецифичных рибо- и гаплотипов можно объяснить проявлением микроэволюционных механизмов адаптации паразита к смене промежуточного хозяина. Важность влияния хозяев на создание генетически

отличных линий паразита признается в течение длительного времени. Спектр хозяев может существенно влиять на внутривидовую генетическую структуру и создавать барьеры, препятствующие потоку генов (Nadler et al., 2000; McCoy et al., 2001; Johnson et al., 2002, McCoy et al., 2005).

4.2. Пространственные структуры биомолекул. Структуры транскриптов ITS1 *Nanophyetus* оказались одними из самых сложно организованных среди исследованных видов трематод (например, Michot et al., 1993; Capriotti, Marti-Renom, 2008; Lotfy et al., 2010; Tatonova et al., 2012). Идентификация консервативных мотивов указывает на сохранение функциональности ITS регионов. Найденные нами у нанофьетусов мотивы 5'-UGGU-3' характерны для эукариот (Schultz et al., 2005; Ghtani et al., 2012; Coleman et al., 2015). Как у всех трематод (Morgan, Blair, 1998), в ITS2 нанофьетусов мы обнаружили консервативный участок 5'-GAGUCGUGGCUCA-3' в домене C, в то время как консервативный участок 5'-GGGUGCCAGAUC-3' имел только гомологичные последовательности. Основываясь на имеющихся данных по другим видам паразитов (Schönian et al., 2001; Köhler et al., 2006; Tatonova et al., 2012), можно предположить, что видовые особенности конформации ITS1 при сохранении общего паттерна укладки могут быть связаны с изменением вирулентного потенциала нанофьетусов.

В данной работе впервые проведено моделирование переменных доменов вторичных структур SSU рРНК трематод из 10 семейств отряда Plagiorchiida, включая такие виды высокой эпидемиологической значимости, как фасциолы, описторхисы, клонорхисы, парагонимусы и т.п. Общий вид предполагаемой вторичной структуры SSU рРНК *Nanophyetus* spp. соотносится с другими эукариотическими моделями (Armache et al., 2010; Yu et al., 2013; Petrov et al., 2014; Chelomina et al., 2016), но имеет ряд отличительных особенностей. Изменения в организации вторичных структур 18S рРНК иерархичны (De Rijk et al., 1992). По нашим данным, у трематод участки ES6^S и ES9^S семействоспецифичны, что открывает перспективу их использования в настоящее время востребованных филогенетических исследованиях.

Нами впервые были реконструированы 2D и 3D модели структуры белка первой субъединицы NADH-дегидрогеназы *N. schikhobalowi* и других видов трематод. Моделирование трёхмерных структур белковых молекул (мембранного комплекса, цитохромных, дыхательных, иммуноглобулинов, нейротрансмиттеров) эпидемиологически значимых видов трематод в последнее время набирает темпы и появляется всё больше работ по этому направлению (Pakharukova et al., 2012; Akalesh et al., 2013; Swargiary, Akalesh, 2015; Zhu et al., 2016; Kim et al., 2017), являющемуся перспективным для медицинских исследований, в частности, разработки новых вакцин,

антибиотиков и противогельминтных препаратов (Moazed, Noller, 1987; Zhu et al., 2016).

4.3. Филогения рода *Nanophyetus*. По данным последовательностей гена 18S рДНК трематод нами были реконструированы несколько типов иерархических филогенетических древ. На хронограмме видно, что подотряды Echinostomata, Xiphidiata, Pronoccephalata и Opisthorchiata разделились примерно 90–125 млн. лет назад, в меловой период. Возраст соотносится с датировкой яиц трематод в копролитах гигантских ящеров, находящихся, как известно, в этот период на пике своего расцвета (Poinar, Boucot, 2016). При этом вторичные структуры ES6^S и ES9^S за все время дивергентной эволюции трематод, т.е. за миллионы лет, не изменили своей общей архитектуры. У троглотрематид, где самые молодые виды рода *Nanophyetus* разделились 2,5 млн.л.н., во всех вторичных структурах, за исключением h16, h17 и h44-ES12^S, имелись уникальные модели доменов и спиралей. Весьма примечательно, что печеночные и легочные трематоды характеризуются различными конформациями ES3с. Фолдинг ES7^S печеночных и легочных трематод также отличается, в то время как кишечные трематоды имеют все варианты укладки, а представители семейства Notocotilidae – уникальную вторичную структуру. Всё это может говорить о том, что эволюция вторичных структур 18S у трематод продолжается, хоть и движется медленными темпами, и видимо связана с приобретением новых адаптаций.

4.4. Филогеография и демографическая история популяций *Nanophyetus*. Из-за особого образа жизни популяции паразитов испытывают в ходе своей эволюции различные демографические изменения, которые отражены в их современном генофонде. Разная глубина филогеографического разрыва у близкородственных видов, имеющих отличия в экологических предпочтениях, предполагает существование разных региональных рефугиумов и различные способы выживания во время четвертичных оледенений (Michaux et al., 2005). Согласно полученным данным, демографический рост популяций *N. schikhobalowi* произошел в среднем плейстоцене, в эпоху Тобольского (400 – 250 тыс. лет назад) межледниковья Западной Сибири. Однако аналогичные события в популяциях *N. salmincola* и *N. japonensis* больше соответствуют среднеплейстоценовому Ширтинскому (190 – 180 тыс. лет назад) межледниковью в России, соответствующему Ярумтскому межледниковью в Северной Америке.

Анализ байесовских контурных диаграмм со средним и медианным значением *NeT* демонстрирует наличие общего тренда развития популяций нанофиетусов. Однако генетические потери видов с момента разделения основных филетических линий разные. Наиболее уязвимой оказалась популяция *N. japonensis*, у которой эффективный размер популяций так и

остался в области пониженных значений. Интересно, что по временным параметрам стабилизация численности нанофиетусов совпадает с периодом начала резкого роста популяций кеты в голоцене (общего второго промежуточного хозяина *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*), продолжающегося и по настоящее время (Маляр, 2017).

В среднем плейстоцене на юге российского Дальнего Востока происходили значительные изменения в речных системах (отчасти из-за вулканической активности), что могло повлиять на структуру популяции *N. schikhobalowi*. Наличие двух филогенетических линий с разными демографическими историями для рек Илия и Комиссаровка может указывать либо на двухэтапную инвазию, либо на существование двух предковых рефугиумов для этих речных систем. Известно, что озеро Ханка играет важнейшую роль в гнездовании и сезонной миграции птиц, в том числе из Северной Америки. Так как *N. salmincola* может паразитировать у утиных, не исключена вероятность, что в прошлом эти птицы способствовали распространению нанофиетоза на Дальнем Востоке и между континентами.

К сожалению, межвидовые филогении не могут строго проверить альтернативные гипотезы относительно географии видообразования (Philippe, Laurent, 1998; Nieberding et al., 2004; Huysse et al., 2005). Построенные в BEAST древа для одновременной оценки времени дивергенции рыб и трематод показывают, что видообразование нанофиетусов и их хозяев совпадает, т.е. возможно ко-видообразование. Вопрос, было ли видообразование нанофиетусов алло- или симпатрическим остается открытым. Мы приводим данные, исключая концепцию ретикулярной, или сетчатой, эволюции нанофиетусов, потому что данные по ядерной и митохондриальной ДНК хорошо совпадают. Вместе с тем, весьма вероятно, что у нанофиетусов были реализованы различные механизмы видообразования, поскольку у *N. schikhobalowi* и *N. salmincola* генетические различия пропорциональны географическим дистанциям и времени изоляции (Северная Америка и Евразия разделились раньше, чем образовались Японские острова: 80 млн. лет назад и 30 млн. лет назад соответственно), но не согласуются с морфологическими различиями. *N. japonensis* морфологически хорошо дифференцирован с обоими видами, но генетически ближе к *N. schikhobalowi*. Это контрастирует с данными по *N. schikhobalowi* и *N. salmincola*, которые имеют высокое морфологическое сходство, но высокие генетические различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании 133 нуклеотидных последовательности генов и спейсерных областей рибосомного кластера ядерного генома и нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК кишечных трематод рода *Nanophyetus* (*N. schikhobalowi*, *N. japonensis* и *N. salmincola*) были

определены, депонированы в международную базу данных GenBank и проанализированы совместно с 257 доступными последовательностями ДНК трематод. Реконструированы вторичные структуры рДНК транскриптов, а также вторичная и третичные структуры первой субъединицы NADH-дегидрогеназы. Показаны отличия в генетической изменчивости видов, дополнительно подтвержденные их демографическими структурами, выявленными с использованием статистических данных, а также с помощью коалесцентного подхода. С помощью филогенетических реконструкций, позиционировано положение исследуемых видов на разных иерархических уровнях: род, надсемейство, отряд. По совокупности полученных данных восстановлен видовой статус *N. schikhobalowi* и подтвержден статус видов для *N. japonensis* и *N. salmincola*. В ходе анализа внутривидовой изменчивости *N. schikhobalowi* обнаружены географические и хозяиноспецифические особенности, указывающие, что не только география, но и смена хозяина являются важными факторами, структурирующими популяции паразита. Поскольку коэволюционные взаимодействия могут сильно расходиться во времени и пространстве, важно количественно оценить и сравнить филогенетические вариации, как хозяина, так и паразита в их географическом диапазоне (Sures, 2004). Связь между такими микроэволюционными и макроэволюционными событиями плохо изучена. В настоящем исследовании мы попытались связать два этих процесса, лежащих в основе диверсификации трематод. Наши данные хорошо согласуются с гипотезой Красной Королевы (Red Queen hypothesis: Van Valen, 1973; Curtis, Lively, 2010), согласно которой взаимодействие паразитов и их хозяев ведет к постоянному естественному отбору для адаптации и контрадаптации и способствует пространственной мозаичности.

ВЫВОДЫ

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

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

3. Локальные популяции *N. schikhobalowi* из разных речных систем и видов рыб-хозяев отличаются уровнем генетической изменчивости, характером распределения нуклеотидных замен в последовательностях гена

nad1 мтДНК и ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, рибо- и гаплотипическим составом, а также демографическими историями. Выявленное ограничение генных потоков в совокупности с перечисленными различиями исключает их полную панмиксию и может быть свидетельством микроэволюционной адаптации паразита к смене хозяина.

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

5. Сеть гаплотипов мтДНК *N. schikhobalowi* представлена тремя основными филогенетическими линиями, имеющими разные предковые гаплотипы, демографические истории и географическое распределение, что предполагает неоднократное заселение исследованных речных систем из различных плейстоценовых рефугиумов.

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

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

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

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Воронова А.Н.**, Челомина Г.Н. Высокая дивергенция двух морфологически близких видов трематод рода *Nanophyetus* лососевых рыб по данным последовательностей гена *nad1* мтДНК // Биология моря. 2018. Т. 44, № 2. С. 115–119.
2. **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.
3. **Voronova A.N.**, Chelomina G.N. Genetic diversity and phylogenetic relations of salmon trematode *Nanophyetus japonensis* // Parasitology International 2018. Vol. 67. P. 267–276.

Работы в материалах конференций:

4. **Воронова А.Н.**, Челомина Г.Н. Таксономическая идентификация и филогенетические связи кишечных трематод рода *Nanophyetus* // Генетика популяций: прогресс и перспективы, 17–21 апреля 2017, Москва. – М.: «Ваш Формат», 2017. С. 63.
5. **Voronova A.N.**, Chelomina G.N., Besprozvannykh V.V. Restitution and genetic differentiation of *Nanophyetus* populations // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, September 1–10, 2015, Vladivostok. – Vladivostok: Program & Abstracts, 2015. P. 81.
6. **Voronova A.N.**, Chelomina G.N. Genetic divergence of human pathogens *Nanophyetus* spp. (Trematoda: Troglotrematidae) // International Conference on Genomic Medicine, February 22–24, 2017, Baltimore. – Baltimore MD, USA: United Scientific Group, 2017. P. 50.
7. **Voronova A.N.**, Chelomina G.N. Secondary structure prediction for the 18S rRNA across Trematoda families // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, September 3–8, 2017, Vladivostok. – Vladivostok: Program & Abstracts, 2017. P. 47.

БОРОНОВА АНАСТАСИЯ НИКОЛАЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
СВЯЗИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИДОВ ТРЕМАТОД
РОДА *NANOPHYETUS* CHARIN, 1926
(TREMATODA: TROGLOTREMATIDAE)**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук