

**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

На правах рукописи

Белодед Алина Юрьевна

**МОРФОЛОГИЯ, СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ  
ТРЕМАТОД СЕМЕЙСТВА HARPORIDAE NICOLL, 1914  
ВОСТОЧНОАЗИАТСКОГО РЕГИОНА**

1.5.12. Зоология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
к.б.н. Атопкин Д. М.

Владивосток – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Введение.....                                                                                                         | 3   |
| Глава 1 Обзор литературы.....                                                                                         | 10  |
| 1.1. Положение Harpororidae в системе Digenea.....                                                                    | 10  |
| 1.2. Систематика и филогенетические связи внутри семейства<br>Harpororidae .....                                      | 13  |
| 1.3 Характеристика жизненных циклов гаплопорид .....                                                                  | 18  |
| Глава 2 Материалы и методы.....                                                                                       | 20  |
| 2.1 Сведения об использованном материале.....                                                                         | 20  |
| 2.2 Сведения об использованных методах .....                                                                          | 28  |
| Глава 3 Результаты и обсуждения .....                                                                                 | 41  |
| 3.1. Морфология, таксономия и систематика представителей<br>рода <i>Parasaccocoelium</i> .....                        | 41  |
| 3.2. Морфология, таксономия и систематика представителей<br>рода <i>Skrjabinolecithum</i> .....                       | 56  |
| 3.3. Морфологическая и генетическая характеристика<br>трематод родов <i>Unisaccus</i> и <i>Paraunisaccoides</i> ..... | 78  |
| 3.4. Морфологические и молекулярные критерии в<br>систематике Harpororidae .....                                      | 93  |
| 3.5. Внутренние филогенетические связи Harpororidae на<br>основании молекулярных данных .....                         | 110 |
| Заключение.....                                                                                                       | 117 |
| Список литературы.....                                                                                                | 120 |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Семейство трематод *Naplororidae* Nicoll, 1914 объединяет паразитических плоских червей паразитирующих в кишечнике преимущественно морских, эстуарных и реже пресноводных рыб. Характерные морфологические признаки представителей этого семейства наличие гермафродитной сумки цирруса и одного семенника, реже - двух. Положение *Naplororidae* в системе *Digenea* Carus, 1863 (дигенетических сосальщиков) окончательно не установлено, несмотря на имеющиеся, на сегодняшний день, результаты исследований этой группы червей. Олсон с коллегами (Olson et al., 2003), анализируя филогенетические связи внутри дигеней, основанные на молекулярных данных, охарактеризовал положение *Naplororidae*, оказавшихся среди представителей отряда *Xiphidiata* Olson, Cribb, Tkach, Bray, Littlewood, 2003, как аномальное, из-за отсутствия у гаплогорид ключевого признака *Xiphidiata* – наличия стилета у церкарий. Позже в результате анализа филогенетических связей *Digenea* на основе молекулярных данных, *Naplororidae* были возведены в ранг подотряда *Naplororata* Perez-Ponce de Leon, Hernandez-Mena, 2019 отряда *Plagiorchiida*. В настоящее время в семействе *Naplororidae* насчитывается 10 подсемейств, большинство из которых выделено на основе комплексных морфологических и молекулярных данных.

Ранее было показано, что большинство представителей *Naplororidae* подразделяются на хозяинно-специфические группы на уровне подсемейств. Так, наиболее многочисленные *Naplororinae* Nicoll, 1914, *Chalcinotrematinae* Overstreet, Curran, 2005, *Forticulcitinae* Blasco-Costa, Balbuena, Kostadinova, Olson, 2009 и *Waretrematinae* Srivastava, 1937, за редким исключением – паразиты эвригалинных кефалевых рыб *Mugilidae* Jarocki, 1822. Некоторые трематоды *Chalcinotrematinae* – инфицируют пресноводных рыб (*Characiformes* Regan, 1911, *Cichliformes* Bleeker, 1859 и др.), а трематоды *Megasoleninae* Manter, 1935 – морских рыб (*Perciformes* Bleeker, 1859 и др.) (Yamaguti, 1971; Nasir, Gomez, 1976; Overstreet, Curran, 2005). При этом ареалы трематод, числящихся в составе отдельных родов некоторых из этих подсемейств, в основном приурочены к определенным географическим

областям (Yamaguti, 1971; Nasir, Gomez, 1976; Overstreet, Curran 2005). Тем не менее, консолидированные данные получены далеко не для всех представителей подсемейств, поэтому их таксономический статус окончательно не установлен. Например, крайне мало внимания было уделено представителям семейства Waretrematinae, распространенным главным образом на территории Индо-Западной Пацифики (Overstreet, Curran, 2005). Систематические и филогенетические исследования этой группы трематод на основании консолидированных данных ограничивались работами австралийской группы паразитологов, которые обосновали новый род *Capitimitta* Pulis, Overstreet, 2013 и несколько видов в составе рода *Spiritestis* Nagaty, 1948 (Pulis, Overstreet, 2013). Также была проведена ревизия систематического положения рода *Intromugil* Overstreet, Curran, 2005, обоснованного ранее Overstreet and Curran, 2005 в составе Waretrematinae (Pulis et al., 2013). Филогенетическое положение Waretrematinae в пределах Harpororidae также оставалось неясным. С одной стороны Blasco-Costa et al. (2009a), обосновав подсемейство Forticulcitinae, показали его базальное положение относительно остальных кефалевых гаплопорид, не включив в анализ представителей Waretrematinae. Позже, Pulis и Overstreet, 2013 реконструировали филогенетические связи Harpororidae на основании нуклеотидных последовательностей 28S рДНК, с учетом полученных ими данных для некоторых видов трематод Waretrematinae. В результате оказалось, что роды Waretrematinae, а именно *Spiritestis* и *Capitimitta* находились в составе единой политомичной клады вместе с *Saccoclelioides* Szidat, 1954, представителем Chalcinotrematinae, а вид *Forticulcita gibsoni* Blasco-Costa, Montero, Balbuena, Raga, Kostadinova, 2009 занимал базальное положение к этой кладе, но не ко всем Harpororidae. Эти результаты показали необходимость значительного расширения консолидированных данных для Waretrematinae и пересмотра филогенетических связей Harpororidae с учетом этих данных.

Вопросы, касающиеся биоразнообразия и таксономии Harpororidae актуальны как для российского Дальнего Востока, так и для Восточноазиатского региона в целом. До недавнего времени в пределах Дальнего Востока России

числились только два вида *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 и *Parasaccocoelium mugili* Zhukov, 1971, а на остальной восточноазиатской территории было зарегистрировано около 20 видов. При этом, на территории Вьетнама, входящей в спектр наших интересов, представители Harpororidae не обнаруживались (Belous, 1954, Machida, 1996, Liu et al., 2010). Использование гаплопоридами рыб Mugilidae, в качестве окончательных хозяев, а также обнаружение этих трематод в рыбах, приуроченных к опресненным водоемам, позволило Мантеру в 1957 году выдвинуть гипотезу «экологического моста» об адаптации трематод морских рыб, через освоение эвригалинных рыб к паразитированию в пресноводных рыбах (Manter, 1957); в пользу этой гипотезы высказывался ряд других авторов на основании дополнительных морфологических, экологических и молекулярных данных (Paperna, Overstreet, 1981; Blasco-Costa et al., 2009b). Однако для подтверждения гипотезы Мантера необходимы более расширенные знания о видовом разнообразии и распространении Harpororidae с привлечением филогенетического анализа, основанного на молекулярных данных. Кроме того, необходим анализ внутривидового разнообразия и популяционно-генетической структуры видов гаплопорид, гипотетически непосредственно связанных с процессами переключения между окончательными хозяевами разных экологических групп. Актуальность изучения биоразнообразия Harpororidae также обусловлена высоким таксономическим разнообразием кефалевых рыб. В настоящее время комплексные данные известны для видов гаплопорид от весьма ограниченного круга кефалей, включая *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758, *M. crenilabis* Forsskål, 1775 *Planiliza haematocheilum* Temminck, Schlegel, 1845, *P. Subviridis* Valenciennes, 1836, *P. Vaigiensis* Quoy, Gaimard, 1825, *Crenimugil seheli* Fabricius, 1775, *Osteomugil engeli* Bleeker, 1858, *O. cunnesius* Valenciennes, 1836. При этом в ряде регионов, например, в прибрежных водах Вьетнама, насчитывается от 22 до 28 видов кефалевых рыб (Tran et al., 2015), отличающихся по ряду биологических и экологических критериев, что, несомненно, определяет перспективность таксономических, экологических и генетических исследований гаплопорид.

Таким образом, данных, для разработки оптимальной стратегии использования разных критериев для определения географии видов *Harporidae*, их систематики и филогении, имеющихся на сегодняшний день недостаточно. В частности, имеется крупный пробел в знаниях о морфологии, распространении и генетического разнообразия представителей *Waretrematinae* восточноазиатского региона, где регистрируются кефалевые рыбы. Поэтому существует необходимость более глубокого изучения представителей этого подсемейства гаплопорид в восточноазиатском регионе. Наибольший интерес в этом отношении представляет регион юга Дальнего Востока России, поскольку там были описаны типовые виды некоторых родов *Waretrematinae*, а также морские и эстуарные воды Вьетнама, характеризующихся значительным видовым разнообразием кефалевых рыб.

**Цель** – определить видовое разнообразие и реконструировать филогенетические связи трематод семейства *Harporidae*, циркулирующих через кефалевых рыб юга Дальнего Востока России и Вьетнама.

**Задачи:**

1. С использованием морфологических и молекулярных данных выявить число валидных видов *Harporidae* от кефалевых рыб юга Дальнего Востока России и прибрежных вод Вьетнама.
2. Используя данные секвенирования нуклеотидных последовательностей рибосомной ДНК реконструировать и проанализировать филогенетические связи внутри семейства *Harporidae*;
3. На основании данных секвенирования нуклеотидных последовательностей рибосомной ДНК оценить изменчивость представителей *Harporidae* на юге Дальнего Востока России.
4. Выявить степень согласованности морфологических и молекулярных признаков, используемых в таксономии *Harporidae*.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Видовое разнообразие гаплогорид, циркулирующих в кефалевых рыбах юга Дальнего Востока России, значительно выше, чем предполагалось ранее, и сопоставимо с таковым для кефалевых рыб Вьетнама.
2. Корреляции между молекулярной дифференциацией видов трематод и их различиями по некоторым индивидуальным морфометрическим показателям внутри изученных родов подсемейства Waretrematinae представляют исключительно индивидуальный для каждого рода случай согласованности (или несогласованности) и не могут быть унифицированы.
3. Гипотеза “экологического моста” Мантера о ключевой роли кефалевых рыб в переключении трематод Harpororidae с морской ихтиофауны на пресноводную подтверждается результатами филогенетического анализа, основанного на молекулярных данных.

**Личный вклад автора.** Соискатель принимал непосредственное участие на всех этапах исследования: планирование всех стадий исследования, сбор материала на территории Приморского Края и его камеральная обработка, участвовал в изготовлении препаратов и их описании, провел все работы по получению нуклеотидных последовательностей и построению филогенетических реконструкций.

**Научная новизна.** В работе представлены морфологические и молекулярные данные для семи новых для науки видов трематод, принадлежащих к подсемейству Waretrematinae заражающих кефалевых рыб Азиатско-Тихоокеанского региона. На основании комплексных данных восстановлены рода *Parasaccocoelium* и *Paraunisaccoides*, переописан типовой вид рода *Skarjabinolecithum* – *S. spasskii*. Впервые исследованы представители этих родов и *Unisaccus* обнаруженные в кефалевых рыбах Вьетнама. Впервые на основе молекулярных данных проанализирована внутривидовая изменчивость одного из представителей семейства Harpororidae – *S. spasskii*. Получены новые данные по вопросу корреляции морфологических и молекулярных признаков используемых в таксономии Harpororidae.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты работы существенно дополняют знания о разнообразии и распространении паразитофауны рыб в дальневосточных морях и прибрежных водах Вьетнама. Полученные данные соответствуют ряду критических технологий РФ, а именно: биомедицинские и ветеринарные технологии, геномные технологии, технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения. Практическая значимость работы заключается в предоставлении новых данных о паразитофауне промысловых видов рыб и циркуляции паразитов на промысловых территориях. Полученные результаты также пригодны для надежной идентификации трематод с помощью морфологических и молекулярных методов. Полученные результаты работы могут быть включены в курсы лекций для студентов по специальностям «паразитология» и «зоология».

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, включая международный симпозиум Molecular Phylogenetics: Contributions to the 4th Moscow International Conference (MolPhy-4), 2014, г. Москва; Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке: материалы V Межрегиональной конференции, 2015, г. Новосибирск; Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, (Владивосток, Морская биологическая станция «Восток», 2015) и на VII Съезде Паразитологического общества, Петрозаводск, 2023 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 10 работ. Из них 6 опубликованы в рецензируемых зарубежных и российских изданиях из списка ВАК, 4 работы опубликованы в материалах всероссийских и международных научных конференций и международного симпозиума. Во всех публикациях автор принимал участие в сборе материала, проведении морфологических исследований, получал молекулярные данные, проводил обработку этих данных, выполнял филогенетические реконструкции, участвовал в подготовке материала к публикации вместе с соавторами.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и 22 таблицами. Список литературы насчитывает 95 наименований, из них 86 на иностранном языке.

**Благодарности.** Автор от всей души благодарит своего научного руководителя к.б.н. Атопкина Дмитрия Матвеевича за помощь на всех этапах выполнения диссертации, ценные советы, обучение и поддержку. Автор выражает огромную благодарность заведующему лаборатории паразитологии д.б.н. Беспрозванных В.В. за существенный вклад в проведение морфологических исследований и обучение методикам изготовления препаратов, Нго Х.Д., Ха Н.В., Танг Н.В. за любезно предоставленный материал из Вьетнама и совместную работу; к.б.н. Ермоленко А. В. за ценные советы и плодотворную совместную работу. Автор искренне признателен д.б.н. профессору Челоминой Г. Н. и всему коллективу лаборатории паразитологии за ценные советы и поддержку.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ № 22-24-00896 и Vietnamese National Foundation for Development of Science and Technologies № 106.15 2012.8

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Положение *Haploporidae* в системе *Digenea*

Семейство *Haploporidae* было основано Николль в 1914 в результате повышения таксономического ранга подсемейства *Haploporinae*, которое было основано в 1902 году Лооссом для объединения четырех родов трематод: *Haploporus* Looss, 1902, *Dicrogaster* Looss, 1902, *Lecithobothrys* Looss, 1902 и *Saccocoelium* Looss, 1902. Эти трематоды паразитируют в кишечнике рыб и отличаются набором морфологических признаков, благодаря которым они были вынесены в отдельное подсемейство: большое количество кутикулярных шипиков, короткие кишечные стволы, наличие гермафродитной бурсы и др. В 1939 году Сривастава описал новую трематоду, извлеченную из лобана *Mugil waigiensis* Quoy, Gaimard, 1825 (Индия), которую назвал *Waretrema piscicola*, Srivastava, 1937 и изначально рассматривал этот вид как представителя *Haploporidae*. Однако, в связи с наличием нескольких отличительных признаков: наличие шестилепестного венчика вокруг ротовой присоски, а так же особенностей структуры и расположения желточников, род *Waretrema*, Srivastava, 1937 стали рассматривать в качестве отдельного семейства *Waretrematidae* Srivastava, 1939. Новый вид трематод был описан Белоус в 1954 (Belous, 1954) году от *Planiliza haematocheilus* Temminck, Schlegel, 1845 (ранее *Mugil so-iuy* Basilewsky, 1855) (река Раздольная (Суйфун), Дальний Восток) и отнесен к семейству *Haploporidae*. Между новым видом, названным *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 и *W. piscicola* были выявлены сходные морфологические признаки, а именно: одинаковое расположение репродуктивной системы, строение выводных протоков половой системы, матки, а также строение желточников. Также было отмечено, что окончательным хозяином и у *W. piscicola* и *S. spasskii* выступают рыбы рода *Mugil*, что характерно для большинства родов *Haploporidae*. Белоус в своих работах отмечает, что особенности морфологии *S. spasskii* позволяют рассматривать этот вид как промежуточное звено между представителями семейств *Haploporidae* и *Waretrematidae* и по её мнению, семейство *Waretrematidae* должно считаться синонимом *Haploporidae*. В конечном

итоге Белоус выделяет в составе семейства *Harpororidae* два подсемейства: *Waretrematinae* и *Harpororinae*. Скрыбин в своей книге, посвященной семейству *Harpororidae* (Скрыбин, 1956), соглашается с точкой зрения Белоус в необходимости объединения *Waretrematidae* и *Harpororidae* в одно семейство, на правах двух самостоятельных подсемейств, при условии уточнения и дополнения их диагнозов.

В 1961 году Мехра обосновывает для семейств *Waretrematidae* и *Harpororidae* надсемейство *Harpororoidea* Nicoll, 1914, связывая их по сходству расположения и строения половой системы (Mehra, 1961). Так же в это надсемейство он включает *Harposplanchnidae* Poshe, 1925 и *Megaperidae* Manter, 1934, объединяя их по схожести жизненных циклов и строению церкарий. Ямагути (1939) выделяет семейство *Atractotrematidae* Yamaguti, 1939 которое, по его мнению, было близко к *Fellodistomidae* Nikoll, 1909. Скрыбин признал его как единственный род *Atractotrema* Goto, Ozaki, 1929 в подотряде *Fasciolata* Stryabin et Schulz, 1935. В настоящее время представителей этого семейства относят к *Harpororoidea*. В 1976 году Насир и Гомез пересмотрели состоятельность гаплопорид и родственных им семейств и обосновали, что *Harpororidae* вместе с *Atractotrematidae*, *Megasolenidae* Manter, 1935 *Waretrematidae*, *Harposplanchnidae* и *Megaperidae* должны относиться к отряду *Harpororiformes* (Brooks, O'Grady, Glen, 1985). Крибб с соавторами рассматривал гаплопорид, атрактотрематид, варетрематид и мегасоленид, как очень близких друг другу, следуя точке зрения Насира и Гомеса (Cribb et al., 1998). В 2005 году по результатам проведенной ревизии в надсемейство *Harpororoidea* вошли представители *Harpororidae* и *Atractotrematidae* на основании наличия у них гермафродитной сумки. При этом *Harposplanchnidae* были возведены в ранг отдельного надсемейства, а *Megaperidae* включены в состав *Lepocreadioidea* Odhner, 1905. Таким образом, исходя из последней ревизии, основанной на морфологических данных рассматриваемых групп трематод, в состав *Harpororoidea* были включены два семейства *Harpororidae* и *Atractotrematidae* в состав первого, из которых вошли трематоды подсемейств *Harpororinae*, *Chalcinotrematinae*, *Megasoleninae* и *Waretrematinae*

(Overstreet, Curan, 2005). В настоящее время семейство Atractotrematidae сведено в синонимы с Emprostiotrematidae Cianferoni, Ceccolini, 2021, на основании того, что название Atractotrema ранее было утверждено для рода *Atractotrema* Cossmann, 1888 (сем. Fissurellidae J. Fleming, 1822, Gastropoda) (Cianferoni, Ceccolini, 2021).

Положение Harporoidea в системе Digenea на основании молекулярных данных было впервые продемонстрировано Олсоном с соавторами в 2003 году (Olson et al., 2003). В результате анализа консенсусного дерева, реконструированного по объединенным данным полноразмерного гена 18S рРНК и фрагмента гена 28S рРНК был выделен подотряд Xiphiata Olson, Cribb, Tkach, Bray, Littlewood, 2003, объединяющий трематод, имеющих в своем жизненном цикле стилетных церкарий. Представители Harporoidea, церкарии которых не имеют стилета, оказались внутри Xiphiata, образуя терминальную группу, сестринскую по отношению к Paragonimidae Dollfus, 1939. Такое положение гаплогорид авторы работы охарактеризовали, как аномальное, оставив этот вопрос без какого-либо обсуждения.

В 2019 году было проведено масштабное исследование по пересмотру высших таксонов для Digenea (Pérez-Ponce de León, Hernández-Mena, 2019). В качестве маркера был использован участок 28S рДНК, как наиболее представленный для определения филогенетических связей между надвидовыми таксонами. В ходе анализа было установлено, что все основные группы дигеней развивались монофилетически, за исключением подотрядов Xiphiata и Bucephalata La Rue, 1926, а так же надсемейств Gorgoderoidea Looss, 1901 и Allocreadioidea Looss, 1902. По результатам этой работы, представители Harporoidea вошли в кладу, представляющую собой парафилетическое надсемейство Gorgoderoidea (по Olson et al., 2003). Основываясь на своих результатах, авторы предложили для Harporoidea новый подотряд Harporata Pérez-Ponce de León, Hernández-Mena, 2019, на основании того, что церкарии гаплогорид лишены стилета, а наличие гермафродитной бурсы определено как признак надсемейства. Добавление подотряда так же решает вопрос парафилии

Xiphidiata, наблюдаемой на филогенетических реконструкциях, основанных на данных частичного секвенирования гена 28S рРНК.

## 1.2. Систематика и филогенетические связи внутри семейства

### **Haploporidae**

В 2009 году Бласко-Коста (Blasco-Costa et al., 2009) была опубликована первая крупная работа, посвященная реконструкции филогенетических связей внутри семейства Haploporidae на основании данных секвенирования фрагмента гена 28S рРНК и второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) рДНК. Основное внимание было уделено представителям подсемейства Haploporinae. В частности, были представлены молекулярные данные для нового вида рода *Saccocoelium* - *S. brayi* Blasco-Costa, Balbuena, Raga, Kostadinova, Olson, 2010. Также в данной работе были установлены минимальные значения межвидовой дифференциации для представителей семейства Haploporidae: 0.9% по 28S рДНК и 2.1% по ITS2 рДНК. Кроме того, на основе комплексных данных внутри Haploporidae было обосновано подсемейство Forticulcitinae Blasco-Costa, Balbuena, Kostadinova, Olson, 2009 для трематоды *Forticulcita gibsoni* Blasco-Costa, Montero, Balbuena, Raga, Kostadinova, 2009. В 2010 году этими же авторами (Blasco-Costa et al., 2010) в рамках комплексного молекулярно-морфологического исследования был поднят вопрос о проблеме идентификации криптических видов трематод, заражающих кефалевых рыб. В ходе исследования было выявлено 8 морфотипов *Saccocoelium*: два для *Saccocoelium obesum* Looss, 1902 от пиленгаса, четыре для *Saccocoelium. tensum* Looss, 1902 от пиленгаса и два, *Saccocoelium. cephalii* Blasco-Costa, Montero, Gibson, Balbuena, Raga, Kostadinova, 2009 и *Saccocoelium sp.*, от лобана. Это опровергло гипотезу о том, что симпатрические виды кефалей заражает один вид *Saccocoelium* (Mikailov, 1958; Fischthal, Kunz, 1963; Ferreti, Paggi, 1965; Moravec, Libosva'rsky', 1975; Blasco-Costa, 2010 по Dawes, 1947). Сравнительный анализ последовательностей выявил четыре уникальных генотипа, тем самым утвердив видовой статус *Saccocoelium obesum*, *S. tensum*, *S. cephalii* и новый криптический вид *S. brayi* из *Planiliza (Liza) aurata* Risso 1810 и *P. (L.) saliens* Risso 1810, признанный по результатам анализа его морфологии и

генетики. При этом у *S. tensum* и *S. cephalis* наблюдалась вариабельность морфологических признаков, *S. tensum* образовал 4 морфотипа, а *S. cephalis* – 2, причем на генетическом уровне различий внутри каждого из этих видов выявлено не было. Авторы пришли к выводу, что внутривидовая морфологическая вариабельность у *S. tensum* и *S. cephalis* будет вводить в заблуждение при разграничении видов *Saccocoelium* с использованием только морфологического подхода (Blasco-Costa et al., 2010).

В 2013 году вышло две работы, посвященные описанию новых видов и выделению нового рода внутри подсемейства Waretrematinae на основании морфологических и молекулярных данных (Pulis et al., 2013; Pulis, Overstreet, 2013). В работе Pulis et al., 2013 были представлены морфологические и молекулярные данные для нового вида рода *Intromugil* Overstreet, Curran, 2005 - *I. alachuaensis* Pulis, Fayton, Curran, Overstreet, 2013 от лобана, а также сделано переописание существующего вида - *I. mugilicolus* (Shireman, 1964) Overstreet, Curran, 2005. Исследователями были обнаружены две родовые особенности, о которых ранее не сообщалось: вооружённая ротовая присоска и наличие в гермафродитном протоке двух симметричных рядов гранулярных образований, содержащих железистый материал. Ранее род *Intromugil* включал в себя три номинальных вида, паразитирующих у рыб рода *Mugil* и его считали «западным двойником» *Skrjabinolecithum* Belous, 1954, обитающим в восточной части северного полушария (Overstreet, Curran, 2005). По молекулярным данным (Pulis et al., 2013) для *I. alachuaensis*, максимальные отличия между *I. mugilicolus* и *I. alachuaensis* составили 9.4% (ITS1), 5.9% (ITS2) в спейсерном участке, 3.2% в участке 28S и 0.8% в участке 18S рДНК. На основании данной работы, авторы заключили, что род *Intromugil* является более близким к Chalcinotrematinae Overstreet, Curran, 2005, чем к Waretrematinae, а так же предположили значительную конвергенцию морфологических признаков в разных географических районах. Так же они отметили важность молекулярных данных для оценки дивергенции и определения биогеографического происхождения трематод, входящих в состав крупных филогенетических клад.

Наряду с этим Пулис и Оверстритом (Pulis, Overstreet, 2013) были также представлены морфологические и молекулярные данные для ряда других видов подсемейства Waretrematinae: *Spiritestis herveyensis*, *S. machidai* Pulis, Overstreet, 2013, а также обоснован новый род *Capitimitta* Pulis, Overstreet, 2013 с двумя видами, *C. costata* Pulis, Overstreet, 2013 и *C. darwiensis* Pulis, Overstreet, 2013. Кроме того было показано, что вид трематод *Spiritestis herveyensis* Pulis, Overstreet, 2013, обнаруженный у кефали *Moolgarda seveli* Fabricius, 1775 в прибрежных водах Австралии, отличается от *S. arabii* Nagaty, 1948 (Красное море) по морфологическим показателям.

Филогенетический анализ, основанный на данных частичного секвенирования последовательностей 28S рДНК показал, что рода *Spiritestis* и *Capitimitta* поддерживаются, как валидные таксономические единицы внутри Harpororidae и, вместе с *Forticulcita* Overstreet, 1982 и *Saccocoelioides* Szidat, 1954 и объединяются в кладу, сестринскую по отношению к Harpororinae. В 2014 году Андерс с соавторами восстановили род *Litosaccus* (Andres, Pulis, Cribb, Overstreet, 2014) в подсемействе Harpororinae, используя морфологический и молекулярный подходы. Морфологически черви этого восстановленного рода близки к представителям родов *Lecithobotrys* Looss, 1902 и *Pseudolecithobotrys* Blasco-Costa, Gibson, Balbuena, Raga, Kostadinova, 2009. В состав рода *Litosaccus* был включен вид ранее значившийся как *Pseudolecithobotrys brisbanensis* Martin, 1964, а впоследствии как *Lecithobotrys brisbanensis* (Martin, 1964) (Overstreet, Curran, 2005). В работе приводится детальное описание этого вида, а также указаны признаки, не имеющие, по мнению авторов, таксономической значимости и признанные высоковариабельными внутри вида. Молекулярные данные показали, что вид *Litosaccus brisbanensis* кластеризуется вместе с представителями Harpororinae, однако уровень дифференциации этого вида с известными Harpororinae значительно выше, чем между другими представителями подсемейства.

В работе Andres et al. (2015) подсемейство Forticulcitinae было дополнено двумя новыми видами и одним новым родом. Были представлены

морфологические и молекулярные данные для новых видов рода *Forticulcita* - *F. plantana* Andres, Curran, Fayton, Pulis, Overstreet, 2015 и *F. apiensis* Andres, Curran, Fayton, Pulis, Overstreet, 2015. Кроме того, в данной работе был обоснован новый род - *Xiha* Andres, Curran, Fayton, Pulis, Overstreet, 2015, типовым представителем которого стал вид *Xiha. fastigata* (Thatcher, Sparks, 1958; Andres, Curran, Fayton, Pulis, Overstreet, 2015). В этой же работе на основе данных секвенирования гена 28S рРНК были реконструированы филогенетические связи для семейства Harpororidae, в значительной степени дополненные новыми видами по сравнению с работой Blasco-Costa et al. (2009). Топология полученного филогенетического дерева доказывала валидность подсемейства Forticulcitinae, включая все входящие в него виды. Кроме того, представители двух подсемейств, Waretrematinae (*Intromugil*) и Chalcinotrematinae (*Saccocoelioides* Szidat, 1954) оказались в одном кластере, который был значительно дифференцирован от подсемейства Waretrematinae. Однако этот результат был оставлен авторами без внимания со ссылкой на низкую статистическую поддержку этих связей. Позже, Андраде-Гомез (Andrade-Gómez et al., 2017) с соавторами обосновали несколько новых видов внутри рода *Saccocoelioides*, а также привели основания для включения рода *Intromugil* в подсемейство Chalcinotrematinae, что в значительной степени расширило представления о видовом разнообразии этого подсемейства.

В 2018 году Андрес с коллегами (Andres et al., 2018) показали, что представители Atractotrematidae Yamaguti, 1939 формируют монофилетичную группу, сестринскую по отношению к остальным гаплопоридам; обосновали для трематод рода *Harpladena* новое подсемейство Harpladeninae с условным включением в него представителей рода *Myodera* Montgomery, 1957.

В результате проводившихся в период с 2018 по 2020 гг. исследований трематод кефалевых рыб на территориях северного Вьетнама и юга ДВ России были получены новые морфологические и молекулярные данные для представителей Harpororidae. Атопкин с соавторами (Atopkin et al., 2019) опубликовали результаты морфологического и молекулярного анализа трематод, обнаруженных от кефалевых рыб Вьетнама, залив Халонг. Эти трематоды были

морфологически сходны с представителями рода *Haploporus* (Haploporinae), за исключением наличия у новых червей двух семенников. На молекулярном уровне вьетнамские трематоды значительно дифференцировались как от представителей Haploporinae, так и от других подсемейств. На этом основании авторы обосновали для обнаруженных трематод новое подсемейство – Pseudohaploporinae Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, Chalenko, 2018, в состав которого вошел один род *Pseudohaploporus* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, Chalenko, 2018, включающий два вида: *P. vietnamensis* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, Chalenko, 2018 (типовой вид) и *P. planilizum* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, Chalenko, 2018. Позже этими авторами были обнаружены трематоды в кефалевых рыбах Вьетнама (залив Тонкин), сходные на молекулярном уровне с Pseudohaploporinae, но обладающие значительно меньшими размерами семенников. Для этих трематод был выделен новый вид в составе рода *Pseudohaploporus* – *P. pusitestis* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, 2020. В этой же работе были описаны и генотипированы трематоды от кефалей, пойманных в заливе Нячанг, Вьетнам. Морфологически и генетически эти черви были сходны с Pseudohaploporinae, однако отличались от представителей типового рода наличием одного семенника, а также генетическими дистанциями межродового уровня по данным частичного секвенирования 28S рДНК. На этом основании для обнаруженных трематод был выделен новый род *Parahaplororus* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, 2020 с типовым видом *P. elegantus* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, 2020. Таким образом, в составе Haploporidae на сегодняшний день насчитывается восемь подсемейств, большинство из которых выделены на основании анализа морфологических и молекулярных данных.

### 1.3. Характеристика жизненных циклов гаплопорид

В настоящее время публикации по жизненным циклам трематод *Harpororidae* весьма ограничены. В целом известно, что представители этого семейства характеризуются диксенным жизненным циклом, используя в качестве первых промежуточных хозяев солоноватоводных гастропод семейства *Mesogastropoda*, а в качестве окончательных хозяев - морских, эстуарных и пресноводных видов рыб, локализуясь в желудочно-кишечном тракте.

Первые работы по изучению жизненных форм и циклов семейства *Harpororidae* были опубликованы в 70-х годах для видов *Saccocoelioides pearsoni* Martin, 1973, *Carassotrema koreanum* Park, 1938, *C. wui* Tang, Lin, 1979 и *S. carolae* Lunaschi, 1984 (Martin, 1973; Tang, Lin, 1979, Martorelli, 1988).

В 1991 году индийскими учеными была проведена экспериментальная работа по изучению стадий развития трематод *Carassotrema bengalense* Rekharan, Madhavi, 1985 и *Saccocoelioides martini* Madhavi, 1980. Для каждого вида было описано строение церкарии, метацеркарии и взрослой особи (Shameem, Madhavi, 1991).

Жизненные циклы для трематод *Carassotrema bengalense* и *Saccocoelioides martini* были охарактеризованы, как типичные для гаплопорид. Было показано, что, церкарии этих трематод являются невооружёнными, с двумя пигментными глазками и присосками и инцистируются на любом субстрате или поверхностной плёнке воды. Первый промежуточный хозяин общий для обоих видов, моллюск *Stenothyra blanfordiana* G. Nevill, 1880, окончательными хозяевами для *C. bengalense* являются *Mugil cephalus* и *Valamugil cunnesius*, а для *S. martini* - *M. cephalus*, *Planiliza macrolepis* Smith, 1846, *Etroplus suratensis* Bloch, 1790 и *Hilsa ilisha* Hamilton, 1822. Строение церкарий *Carassotrema bengalense* характерно для рода *Carassotrema*, отличаясь от других представителей только пропорциями и размерами тела, а так же наличием или отсутствием плавательной складки на хвосте, однако метацеркариальные цисты отличаются гораздо меньшими размерами, чем у других представителей рода.

Церкарии после выхода из моллюска – первого хозяина, в воду и непродолжительного плавания инцистируются на каком-либо субстрате. Цисты метацеркарий крупные, шаровидные, тонкостенные, с опорным филаментом. У метацеркарий не происходит метаморфоз, а их морфология соответствует таковой церкарий. Взрослые особи достигают половой зрелости к 20 дню инфицирования окончательного хозяина. В 2007 году Шина и Джанарданан (Sheena, Janardanan, 2007) описали жизненный цикл *Hapladena gymnocephali* Sheena, Janardanan, 2007, заражающих стекловидных окуней *Ambassis gymnocephalus* Lacépède, 1802 (район Кожикоди, штат Керала, Индия). Это первая работа по жизненным циклам рода *Hapladena*. В ходе работы было выяснено, что в организме окончательного хозяина церкарии развиваются сразу во взрослую особь, минуя стадию метацеркарии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### 2.1. Сведения об использованном материале

Материалом для исследования послужили 310 экземпляров половозрелых трематод, принадлежащих к семи видам родов *Skrjabinolecithum*, *Parasaccocoelium*, *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* семейства Haploporidae, собранных от кефалевых рыб юга Дальнего Востока России и Вьетнама (Рисунок 1). Из них 249 было использовано для морфологического исследования, 61 для молекулярного анализа. Из водоемов юга Дальнего Востока России обследовано на инфицированность гаплопоридами 25 *Mugil cephalus* (лобан) и 10 *Planiliza haematocheilus* (пиленгас) из реки Раздольная, 10 и 5 соответственно из р. Карасик и 17 и 10 рыб из р. Киевка. На территории Вьетнама половозрелые черви получены от *Planiliza subviridis* (вскрыто 35), *Moolgarda cunnesius* (27 экз.), *M. seveli* (19), *Mugil cephalus* (3) (Таблица 1). Все обследованные виды кефалей были инфицированы трематодами Haploporidae с различной интенсивностью инфицирования от 2 до 300 червей. Черви извлекались из кишечника, промывались в дистиллированной воде и посмертно фиксировались в 70% этаноле. Предварительно перед изготовлением тотальных препаратов, для изучения морфологии трематод, и выделения особей для генетического исследования, среди червей, собранных от каждой рыб, с использованием бинокля ЛОМО МСП-1 (вариант 2), светового микроскопа Nikon Eclipse E 200, отбирали морфологически идентичных особей. После этого из одной их части изготавливали тотальные препараты, а другую использовали для выделения ДНК. При изготовлении препаратов, фиксированных в этаноле червей, вымачивали в дистиллированной воде, окрашивали квасцовым кармином, обезвоживали в этаноле от 50 до 100%, просветляли в гвоздичном масле и заключали в канадский бальзам, на предметном стекле, покрывая червей покровным стеклом. Изучение морфологии червей осуществлялось с использованием светового микроскопа Nokia. Все размеры приведены в микрометрах. Для молекулярных исследований дополнительно были использованы нуклеотидные последовательности трематод из Международного генного банка, указанные в таблице 2.

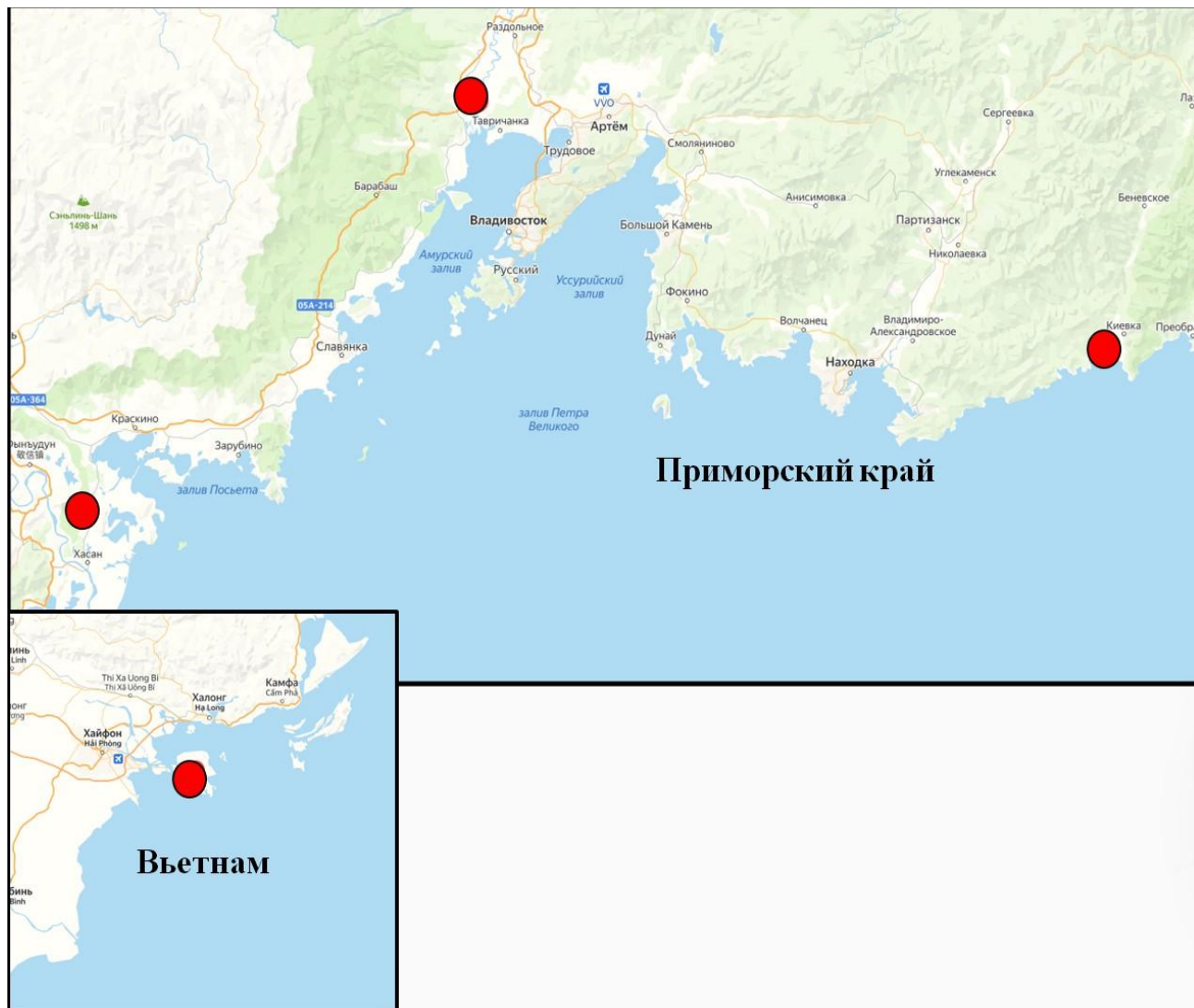


Рисунок 1. Места сбора материала: р. Раздольная, р. Карасик, р. Киевка (Приморский край) и залив Тонкин ( о. Кат Ба, Вьетнам)

Таблица 1. Список исследованных видов (собственные данные)

N - количество образцов трематод использованных для морфологического и молекулярного анализа

| Вид                                    | N,<br>морфологическ<br>ий/молекулярн | Количество<br>вскрытых<br>рыб | Место сбора                                           | Окончательный хозяин            |
|----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Unisaccus tonkini</i>               | 10/5                                 | 10                            | Залив Тонкин, о. Кат Ба, Вьетнам                      | <i>Moolgarda cunnesius</i>      |
| <i>Paraunisaccoides elegans</i>        | 6/4                                  | 5                             | Залив Тонкин, о. Кат Ба, Вьетнам                      | <i>Planiliza subviridis</i>     |
| <i>Unisaccus halongi</i>               | 6/3                                  | 37                            | Залив Тонкин, о. Кат Ба, Вьетнам                      | <i>Moolgarda seheli</i>         |
| <i>Skrjabinolecithum spinosum</i>      | 10/3                                 | 4                             | р. Киевка, Приморский край                            | <i>Mugil cephalus</i>           |
| <i>Skrjabinolecithum pyriforme</i>     | 15/4                                 | 34                            | р. Киевка, Приморский край                            | <i>Planiliza haematocheilus</i> |
| <i>Skrjabinolecithum spasskii</i>      | 25/19                                | 16                            | р. Раздольная, р. Киевка, р. Карасик, Приморский край | <i>Planiliza haematocheilus</i> |
| <i>Skrjabinolecithum spasskii</i>      | 25/1                                 | 6                             | р. Раздольная, Приморский край                        | <i>Mugil cephalus</i>           |
| <i>Skrjabinolecithum spasskii</i>      | 6/7                                  | 1                             | Залив Тонкин, о. Кат Ба, Вьетнам                      | <i>Mugil cephalus</i>           |
| <i>Parasaccocoelium mugili</i>         | 100/4                                | 10                            | р. Киевка, Приморский край                            | <i>Planiliza haematocheilus</i> |
| <i>Parasaccocoelium haematocheilum</i> | 12/7                                 | 10                            | р. Киевка, Приморский край                            | <i>Planiliza haematocheilus</i> |
| <i>Parasaccocoelium polyovum</i>       | 34/5                                 | 10                            | р. Киевка, Приморский край                            | <i>Planiliza haematocheilus</i> |

Таблица 2. Список видов, использованных для молекулярного анализа (данные из Международного генного банка)

N - количество образцов трематод

| Вид                             | N | Окончательный<br>хозяин         | Номер в генном банке  |                    | Авторы                    |
|---------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
|                                 |   |                                 | 28S                   | ITS1–5.8S–<br>ITS2 |                           |
| <i>Spiritestis hervieyensis</i> | 1 | <i>Moolgarda seheli</i>         | KC206500              |                    | Pulis et al., 2013        |
| <i>Spiritestis herveyensis</i>  | 1 | <i>Moolgarda seheli</i>         | KC206500              |                    | Pulis et al., 2013        |
| <i>Capitimitta costata</i>      | 1 | <i>Selenotoca multifasciata</i> | KC206497              |                    | Pulis et al., 2013        |
| <i>Capitimitta darwinensis</i>  | 1 | <i>Selenotoca multifasciata</i> | KC206498              |                    | Pulis et al., 2013        |
| <i>Saccocoelium brayi</i>       | 1 | <i>Planiliza saliens</i>        | FJ211234              | FJ211244           | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>S. cephal</i>                | 1 | <i>Mugil cephalus</i>           | FJ211233              | FJ211243           | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>S. obesum</i>                | 2 | <i>Planiliza ramada</i>         | FJ211259–<br>FJ211260 |                    | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>S. tensum</i>                | 2 | <i>Planiliza ramada</i>         | FJ211257–<br>FJ211258 | FJ211263           | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>Dicrogaster contracta</i>    | 2 | <i>Planiliza aurata</i>         | FJ211261–<br>FJ211262 | FJ211267           | Blasco-Costa et al., 2009 |

Таблица 2. Продолжение

|                                              |     |                                             |                                                 |                                                 |                           |
|----------------------------------------------|-----|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>D. perpusilla</i>                         | 1   | <i>Planiliza ramada</i>                     | FJ211238                                        | FJ211248                                        | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>Lecithobotrys putrescen</i>               | 1   | <i>Planiliza saliens</i>                    | FJ211236                                        | FJ211246                                        | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>Litosaccus brisbanensis</i>               | 1   | <i>Mugil cephalus</i>                       | KM253765                                        |                                                 | Andres et al., 2014       |
| <i>Haploporus benedeni</i>                   | 1   | <i>Planiliza ramado</i>                     | FJ211237                                        | FJ211247                                        | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>Ragaia lizae</i>                          | 1   | <i>Planiliza aurata</i>                     | FJ211235                                        | FJ211245                                        | Blasco-Costa et al., 2009 |
| <i>Parahaploporus elegantus</i>              | 10  | <i>Moolgarda seheli</i>                     | MN639712-MN639721                               |                                                 | Atopkin et al., 2020a     |
| <i>Pseudohaploporus vietnamensis</i>         | 6/8 | <i>Osteomugil engeli</i>                    | MF774420-<br>MF774421,<br>MF774423-<br>MF774426 | MF774427-<br>MF774429;<br>MF774436-<br>MF774440 | Atopkin et al., 2018      |
| <i>Pseudohaploporus vietnamensis</i>         | 1   | <i>Moolgarda seheli</i>                     | MF774422                                        | MF774431                                        | Atopkin et al., 2018      |
| <i>Pseudohaploporus planilizum</i>           | 3   | <i>Planiliza subviridis</i>                 | MF774417-<br>MF774419                           | MF774433-<br>MF774435                           | Atopkin et al., 2018      |
| <i>Pseudohaploporus pusitestis</i>           | 2   | <i>Moolgarda seheli</i>                     | MH986037,<br>MH986038                           | MF774430,<br>MF774432                           | Atopkin et al., 2020a     |
| <i>Cadenatella americana</i><br>Manter, 1949 | 1   | <i>Kyphosus sectatrix</i><br>Linnaeus, 1758 | MH244117                                        |                                                 | Andres et al., 2018       |
| <i>Cadenatella floridae</i>                  | 1   | <i>Kyphosus incisor</i>                     | MH244118                                        |                                                 | Andres et al., 2018       |

Таблица 2. Продолжение

|                                  |   |                                  |                       |                       |                                      |
|----------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| <i>Forticulcita gibsoni</i>      | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | FJ211239              | FJ211249              | Blasco-Costa et al., 2009            |
| <i>F. apiensis</i>               | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | KP761087              |                       | Andres et al., 2015                  |
| <i>F. platana</i>                | 1 | <i>Mugil liza</i>                | KP761086              |                       | Andres et al., 2015                  |
| <i>F. isabelae</i>               | 1 | <i>Mugil curema</i>              | MT957787              | MT957660              | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>F. macropharyngis</i>         | 1 | <i>Mugil curema</i>              | MW796513              | MW796548              | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>F. minuta</i>                 | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | MT957822              | MT957660              | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>F. venezuelensis</i>          | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | MW796522              | MT957660              | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>Overstreetoides pacificus</i> | 2 | <i>Mugil curema</i>              | MT957753-<br>MT957754 | MT957629-<br>MT957630 | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>Ekuarhuni papillatum</i>      | 2 | <i>Mugil</i> sp.                 | MT957687-<br>MT957688 | MT957587-<br>MT957588 | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>E. mexicanum</i>              | 2 | <i>Mugil</i> sp                  | MW796487-<br>MW796488 | MW796524-<br>MW796525 | Andrade-Gómez et García Valera, 2021 |
| <i>Xiha fastigata</i>            | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | KP761088              |                       | Andres et al., 2015                  |
| <i>Saccocoelioides</i> sp.       | 1 | Unidentified molly (Poeciliidae) | EF032696              |                       | Curran et al., 2006                  |
| <i>S. beauforti</i>              | 1 | <i>Mugil cephalus</i>            | MG925104              | MG925103              | Curran et al., 2018                  |

Таблица 2. Продолжение

|                                    |   |                                 |          |          |                     |
|------------------------------------|---|---------------------------------|----------|----------|---------------------|
| <i>S. elongatus</i>                | 1 | <i>Prochilodus lineatus</i>     | MG925108 | MG925107 | Curran et al., 2018 |
| <i>S. magnus</i>                   | 1 | <i>Cyphocharax voga</i>         | MG925112 | MG925111 | Curran et al., 2018 |
| <i>S. nanii</i>                    | 1 | <i>Prochilodus lineatus</i>     | MG925114 | MG925113 | Curran et al., 2018 |
| <i>S. orosiensis</i>               | 1 | <i>Poecilia gillii</i>          | MG925118 | MG925117 | Curran et al., 2018 |
| <i>S. tkachi</i>                   | 1 | <i>Astyanax aeneus</i>          | MG925122 | MG925121 | Curran et al., 2018 |
| <i>Intromugil mugilicolus</i>      | 1 | <i>Mugil cephalus</i>           | KC430096 |          | Pulis et al., 2013  |
| <i>I. alachuaensis</i>             | 1 | <i>Mugil cephalus</i>           | KC430095 |          | Pulis et al., 2013  |
| <i>Megasolena hystero spina</i>    | 1 | <i>Archosargus rhomboidalis</i> | MH244121 |          | Andres et al., 2018 |
| <i>Megasolena sp. m</i><br>MA-2018 | 1 | <i>Holacanthus ciliaris</i>     | MH244122 |          | Andres et al., 2018 |
| <i>Hapladena acanthuri</i>         | 1 | <i>Acanthurus chirurgus</i>     | MH244119 |          | Andres et al., 2018 |
| <i>H. cf. varia</i>                | 1 | <i>Acanthurus chirurgus</i>     | MH244120 |          | Andres et al., 2018 |
| <i>H. nasonis</i>                  | 1 | <i>Naso unicornis</i>           | AY222265 |          | Olson et al., 2003  |
| <i>Isorchis anomalus</i>           | 1 | <i>Chanos chanos</i>            | KU873018 |          | Andres et al., 2016 |

Таблица 2. Окончание

|                                      |   |                                   |          |          |                      |
|--------------------------------------|---|-----------------------------------|----------|----------|----------------------|
| <i>I. currani</i>                    | 1 | <i>Selenotoca multifasciata</i>   | KU873017 |          | Huston et al., 2018  |
| <i>I. megas</i>                      | 1 | <i>Selenotoca multifasciata</i>   | KU873015 |          | Andres et al., 2016  |
| <i>Pseudomegasolena ishigakiense</i> | 1 | <i>Scarus rivulatus</i>           | AY222266 |          | Olson et al., 2003   |
| <i>Paragonimus westermani</i> ,      | 1 | Неизвестен                        | DQ836244 | DQ836243 | Narain et al., 2006  |
| <i>Monorchis monorchis</i>           | 1 | Неизвестен                        | AF184257 |          | Tkach et al. (2001)  |
| <i>Hurleytrematoides chaetodoni</i>  | 1 | <i>Chaetodon striatus</i>         | MH244116 |          | Andres et al., 2018  |
| <i>Brachycladium goliath</i>         | 1 | <i>Balaenoptera acutorostrata</i> | KR703279 |          | Briscoe et al., 2016 |

## 2.2. Сведения об использованных методах



Рисунок 2. Схема этапов морфологического и молекулярного исследования

### Изготовление препаратов для морфологического анализа

Препараты изготавливались по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Фиксированные в 96% этаноле трематоды извлекались из спирта и помещались на сутки в дистиллированную воду, для гидратации и последующего равномерного проникновения красителя в ткани. Окрашивание проводилось кармином (при высокоинтенсивной окраске черви выдерживались в солянокислом этаноле (1% HCL в 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) для повышения контрастности). Далее образцы поэтапно обезвоживались в этаноле ступенчатой концентрации (от 50% до 100%, в течение 10 минут в каждой концентрации), затем осветлялись гвоздичным маслом, после чего помещались на предметное стекло, покрывались канадским бальзамом и покрывным стеклом.

### Получение тотальной ДНК

Тотальную ДНК получали методом щелочного лизиса “HotSHOT” (Truett, 2006). Необходимые реагенты: щелочной реагент для лизиса (25mM NaOH/0.2mM EDTA), который содержит 1 г NaOH, 0.074 г Na<sub>2</sub> EDTA, 1 л H<sub>2</sub>O (pH около 12, хранить при комнатной температуре); буфер Трис HCl (40 mM Трис HCl) который содержит 6.3 г Трис HCl, 1 л воды (pH около 5, хранить при комнатной температуре). Далее действовали согласно протоколу:

1. поместить трематоду в пробирку;
2. добавить 75 мкл щелочного реагента для лизиса;
3. нагреть до 95°C в течение 5-30 мин;
4. добавить 75 мкл 40mM Трис HCl, pH 4.5, чтобы нейтрализовать смесь;
5. лизат готов для ПЦР, хранить при -20°C.

В силу малых размеров трематод, а также особенностей метода измерения концентрации ДНК не проводились.

### Амплификация отдельных последовательностей ДНК

Амплификация фрагментов гена 28S рРНК (1200 п.н.) и участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (1500 п.н.) проводилась методом полимеразной цепной реакции (Mullis et al., 1986). Фрагмент гена 28S рРНК амплифицировался с использованием прямого DIGL2 и обратного 1500R праймеров (Tkach et al., 2003) (Таблица 3). Фрагмент ITS1 - 5.8S - ITS2 рДНК был амплифицирован с помощью прямого и обратного праймеров BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') и BD2, соответственно, при температуре отжига 54°C (Luton et al., 1992) (Таблица 3).

В состав реакционной смеси объемом 20 мкл для амплификации обоих фрагментов ДНК входили: 0.25 mM каждого праймера, реакционный буфер для Dream Taq ДНК-полимеразы, 1.25 mM каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (смесь дНТФ), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 е.а. (единицы активности, одна единица активности соответствует количеству фермента, необходимому для включения 10 нмолей dNTP) Dream Taq ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, США) и 3 мкл ДНК. Полимеразная цепная реакция обоих фрагментов ДНК проводилась в

амплификаторе GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, США) по следующему протоколу: первичная денатурация – 3 мин при 94 °С, затем 40 реакционных циклов, каждый из которых включал три шага: денатурацию (30 сек при 94 °С), отжиг праймера (30 сек при 55 и 54 °С для 28S рДНК и ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, соответственно), синтез (2 мин 30 с при 72 °С). Реакция оканчивалась дополнительным синтезом в течение 7 мин при 72 °С и охлаждением до 4 °С.

Таблица 3. Праймеры, используемые для амплификации

| Участок рДНК   | Праймер | Последовательность 5'→3' | Ориентация | Ссылка             |
|----------------|---------|--------------------------|------------|--------------------|
| ITS1-5.8S-ITS2 | BD1     | GTCGTAACAAGGTTTCCGTA     | Прямой     | Luton et al., 1992 |
|                | BD2     | TATGCTTAAATTCAGCGGGT     | Обратный   | Luton et al., 1992 |
| 28S            | DIGL2   | AAGCATATCACTAAGCGG       | Прямой     | Tkach et al., 2003 |
|                | 1500R   | GCTATCCTGAGGGAAACTTCG    | Обратный   | Tkach et al., 2003 |

Эффективность и чистота ПЦР проверялась использованием позитивных и негативных контрольных проб, соответственно.

Определение качества ПЦР продуктов осуществлялась с помощью метода горизонтального электрофореза в 1.5% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия, в 0.5X буфере TBE (0.445mM TRIS-HCl, 0.045mM HB, 10mM EDTA) в электрофорезной камере Helicon с использованием источника питания Эльф-8 (ДНК-технология, Россия) при 90 мА и 120 В. Гель фотографировали в проходящем УФ свете с использованием трансиллюминатора N-90K (Benda, Германия). Для оценки длины амплифицированного фрагмента ДНК использовали маркер молекулярного веса 100 bp + 2 kb + 3 kb (Thermo Scientific, США). Продукты ПЦР очищались от остатков олигонуклеотидов и непрореагировавших праймеров методом дефосфорилирования с помощью термочувствительной щелочной фосфатазы (FastAP) и экзонуклеазы I (Exo I) (Thermo Scientific, США) по следующему протоколу (на 1 пробу): dH<sub>2</sub>O – 0.046 мкл, 10x буфер для щелочной фосфатазы (FastAP) – 0.02 мкл, щелочная фосфатаза

(FastAP, 1 а.е./мкл) – 0.1 мкл, экзонуклеаза I (Ехo I, 20 е.а./мкл) – 0.034 мкл. Протокол инкубации - 37°C – 30 мин, 80°C – 15 мин.

### **Секвенирование ДНК**

ПЦР продукты были секвенированы с использованием набора Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit фирмы Life Technologies (США), праймеров для амплификации (Таблица 3) и секвенирования (Таблица 4) в соответствии с протоколом производителя.

Реакцию проводили в амплификаторе GeneAmp 9700 фирмы Applied Biosystems в 10 мкл реакционной смеси, включавшей 2.5 мкл очищенного ПЦР продукта, 1.25 мкл 5X буфера для секвенирования; 1.0 мкл Big Dye; 0.5 мкл праймера. Использовали следующий протокол амплификации: начальная денатурация при 96°C – 1 мин, далее 35 циклов, включающих денатурацию при 96°C – 10 сек, отжиг праймера при 54-55°C – 5 сек и элонгацию при 60°C – 4 мин. Реакция заканчивалась охлаждением до 4°C. Для секвенирования фрагмента ITS1 - 5.8S - ITS2 использовали праймеры BD1, BD2 (Luton et al., 1992), внутренние праймеры 3S (Morgan, Blair, 1995), Hapl2-Rv (Беспрозванных и др., 2015), для участка 28S – праймеры для амплификации и внутренние праймеры 300F, ECD2, 900F (Tkach et al., 2003), 1200R (Lockyer et al., 2003) (Таблица 4).

Продукты секвеноальной реакции очищались методом переосаждения в спиртах в соответствии с протоколом производителя к Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit: к 10 мкл продукта полимеразной цепной реакции добавить 1 мкл 0.125 М EDTA, 1 мкл 2.5 М ацетата аммония и 36 мкл 96% этилового спирта перемешать затем инкубировать 20 мин при -20°C, центрифугировать 20 мин при 15000 об/мин. Спирт слить, добавить 50 мкл 70% этилового спирта, перемешать, центрифугировать 10 мин при 15000 об/мин (повторить 3 раза), затем спирт слить, высушить образец 30 мин при 37°C или 15 мин при 60°C в амплификаторе, далее добавить 13 мкл формамида (денатурирующий агент), денатурировать 3 мин, при 95°C в амплификаторе.

Таблица 4. Внутренние праймеры, используемые для секвенирования

| Участок ДНК    | Праймер | Последовательность 5'→3'       | Ориентация | Ссылка                    |
|----------------|---------|--------------------------------|------------|---------------------------|
| ITS1-5.8S-ITS2 | 3S      | GGTACCGGTGGATCACGTGGC<br>TAGTG | прямой     | Morgan, Blair, 1995       |
|                | Hapl2Rv | CGTTCAAGATGTTCGAT              | обратный   | Беспрозванных и др., 2015 |
| 28S            | 300F    | CAAGTACCGTGAGGGAAAGT<br>TG     | прямой     | Tkach et al., 2003        |
|                | 1200R   | GCATAGTTCACCATCTTTCGG          | обратный   | Lockyer et al., 2003      |
|                | ECD2    | CTTGGTCCGTGTTTCAAGACG<br>G     | обратный   | Tkach et al., 2003        |
|                | 900F    | CCGTCTTGAAACACGGACCAA<br>G     | прямой     | Tkach et al., 2003        |

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов секвеноальной реакции осуществлялось в генетических анализаторах GA 3130 и GA 3500, Applied Biosystems на базе ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

### **Обработка первичных данных секвенирования**

#### **Сборка и выравнивание последовательностей**

Сборка последовательностей осуществлялась с использованием программы SeqScape v. 2.6, Applied Biosystems. Выравнивание последовательностей с последующей статистической обработкой осуществлялось с помощью пакета MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью алгоритма ClustalW (Higgins et al., 1994). Выравнивание высоковариабельных фрагментов рДНК проводили с помощью алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004).

ClustalW - это широко используемый алгоритм для выравнивания любого количества гомологичных нуклеотидных или белковых последовательностей.

Для выравнивания нескольких последовательностей ClustalW использует методы прогрессивного выравнивания: сначала выравниваются наиболее сходные друг с другом последовательности, затем выравниваются все более отдаленные группы последовательностей до тех пор, пока не будет получено общее выравнивание. Алгоритм ClustalW начинается с вычисления приблизительной матрицы расстояний между каждой парой последовательностей на основе оценок их попарного выравнивания. Эти оценки рассчитываются с использованием параметров попарного выравнивания последовательностей ДНК (или белков). Затем алгоритм использует метод объединения соседей с укоренением в средней точке для создания направляющего дерева, которое используется для генерации общего выравнивания. Дерево направляющих служит приблизительным шаблоном для клад, которые, как правило, имеют общие инсерции и делеции. Как правило такой алгоритм обеспечивает наиболее близкий к оптимальному результат, особенно когда набор данных содержит последовательности с разной степенью дивергенции (Higgins et al., 1994).

Алгоритм MUSCLE (Edgar, 2004) использует последовательно два способа расчета дистанций для пары последовательностей:  $k$ -мерные дистанции – дистанции, основанные только на количестве попарных различий без учета типов и частот замен для невыровненных последовательностей. Далее для пары выровненных последовательностей вычисляется их идентичность, которая преобразуется в оценку аддитивного расстояния, применяя поправку Кимуры (Kimura, 1980) для множественных замен на сайт. Полученные матрицы расстояний группируются с использованием алгоритма невзвешенного попарно-группового метода UPGMA (Sneath, Sokal, 1973), что, по мнению авторов алгоритма MUSCLE, дает несколько улучшенные результаты по сравнению алгоритмом объединения соседей Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987), несмотря на ожидание, что объединение соседей даст более надежную оценку эволюционного дерева. Это можно объяснить допущением, что при прогрессивном выравнивании наилучшая точность достигается в каждом узле путем выравнивания двух профилей (наборов множественных выравниваний), которые имеют наименьшее

количество различий, даже если они эволюционно не близки. Несмотря на то, что данный алгоритм изначально разрабатывался для белковых последовательностей, он успешно применяется также и для выравнивания высоковариабельных участков ДНК, поскольку основу для алгоритма составляют множественные выравнивания.

### **Статистический анализ молекулярных данных.**

#### **Оценка вариабельности и дивергенции последовательностей рДНК**

Оценка внутри- и межвидовой генетической дифференциации трематод проводилась путем расчета генетических р-дистанций между парами последовательностей фрагментов рДНК. Генетические дистанции представляют собой долю (р) нуклеотидных сайтов, по которым сравниваемые нуклеотидные последовательности различаются (вариабельные сайты), и рассчитываются как отношение количества вариабельных сайтов к общему количеству сравниваемых нуклеотидов (длина последовательности в парах нуклеотидов, п.н.) (Nei, 1972). Алгоритм расчета р-дистанций не делает никаких поправок на множественные замены в одном и том же сайте, смещения скорости замен (например, различия скоростях замен типа транзиций и трансверсий) или различия в скорости эволюции между сайтами.

#### **Реконструкция филогенетических связей**

Филогенетические связи реконструировались с помощью алгоритмов максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967, Felsenstein, 1981) в программе MEGA 6.06 и алгоритма Байеса (Bayesian Inference, BI) в программе MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck et al., 2001).

Статистическую значимость филогенетических связей оценивали с помощью метода бутстреп (Felsenstein, 1985) для алгоритма максимального правдоподобия и метода постериорных вероятностей для алгоритма Байеса (Huelsenbeck et al., 2001). Реконструкцию дерева минимальных связей (Minimum Spanning Tree, MST) для *Skrjabinolecithum spasskii* выполняли в программе Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2006).

Таблица 5. Используемые модели для реконструкции филогенетических связей

| Род                      | Алгоритм<br>Байеса | Алгоритм<br>максимального<br>правдоподобия | Автор                     |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Skrjabinolecithum</i> | GTR+G+I            | GTR+G+I                                    | Tavare, 1986              |
| <i>Parasaccocoelium</i>  | GTR + I + G        | Не применялся                              | Posada, Crandall,<br>1998 |
| <i>Unisaccus</i> ,       | TVM+G+I            | Не применялся                              | Posada, 2003              |
| <i>Paraunisaccoides</i>  | TVM+G+I            | Не применялся                              | Posada, 2003              |

**Метод максимального правдоподобия**, сокращенно ML (термин был впервые использован в работе Фишера, 1922) - это общий метод оценивания параметров генеральной совокупности с помощью максимизации функции правдоподобия  $L$  выборки (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967).

**Функция правдоподобия  $L$**  есть совместное распределение выборки, которое представляет собой функцию параметра  $\Theta = (\Theta_1, \Theta_2, \dots, \Theta_k)$ .

$\Theta = (\Theta_1, \Theta_2, \dots, \Theta_k)$  - вектор неизвестных параметров модели

Если выборка имеет непрерывное распределение, функция правдоподобия  $L$  описывается совместной плотностью распределения:  $f(x, \Theta) = f_{\Theta}(x_1) \cdot f_{\Theta}(x_2) \cdot \dots \cdot f_{\Theta}(x_n)$ .

В случае если элементы выборки  $X = (X_1, X_2, \dots, X_n)$  имеют дискретное распределение, функция правдоподобия принимает вид  $f(x, \Theta) = P_{\Theta}(X_1 = x_1) \cdot P_{\Theta}(X_2 = x_2) \cdot \dots \cdot P_{\Theta}(X_n = x_n)$ .

Величину  $L(\Theta)$  можно считать мерой правдоподобия значения  $\theta$  при заданной реализации  $x$ .

Пусть  $L$  - функция правдоподобия выборки; при наблюдаемых значениях - является функцией параметров  $\Theta$ .  $\Theta = (\Theta_1, \Theta_2, \dots, \Theta_k)$

Тогда **оценками максимального правдоподобия  $\theta$**  называются наиболее правдоподобные значения  $\Theta$  максимизирующие функцию  $L$ .  $\hat{\Theta} = \operatorname{argmax}_{\Theta} L(x, \Theta)$

Оценки зависят от наблюдений  $x_1, x_2, \dots, x_n$ . В широких предположениях эти оценки являются оптимальными.

Зачастую лучше искать точку максимума функции  $\ln L(\theta)$ , которая совпадает с  $\theta$  в силу монотонности логарифма.

Пусть  $\theta$  - это элемент пространства  $\Omega$ . Если  $\Omega$  открытый интервал, а  $L(\theta)$  дифференцируема и достигает максимума на  $\Omega$  то оценки максимального правдоподобия удовлетворяют уравнению  $\frac{dL(\theta)}{d\theta} = 0$  (<http://statistica.ru>)

**Байесовский подход** в филогенетике дает возможность получить наиболее правдоподобное филогенетическое дерево на основании заданных исходных данных (последовательности ДНК или белков рассматриваемых организмов) и эволюционной модели замен (Laplace, 1986). Для увеличения вычислительной скорости алгоритма расчёт апостериорной вероятности реализуется разными алгоритмами, имеющими в основе метод Монте-Карло для марковских цепей (Larget, Simon, 1999). Основными преимуществами байесовского подхода, в сравнении с методами максимального правдоподобия и максимальной экономии является высокая вычислительная эффективность, возможность работы со сложными моделями эволюции, а также то, что он позволяет выбрать те варианты филогенетических деревьев, которые имеют наибольшее значение апостериорной вероятности (Holder, Lewis, 2003).

Байесовский подход является улучшенной версией вероятностного метода, разработанного английским математиком и священником Томасом Байесом на основе теоремы Байеса. Данный метод был опубликован в 1763 году. Современную формулировку этой теоремы вывел Пьер-Симон Лаплас в 1986 г (Laplace, 1986).

В 1953 году Николас Метрополис ввёл методы Монте-Карло для марковских цепей (MCMC, Markov chain Monte Carlo) (Metropolis et al., 1953). Высокая скорость вычислений и возможность интеграции с методами MCMC превратили байесовский подход в один из наиболее востребованных инструментов статистического заключения, особенно в молекулярной

филогенетике и систематике. В сравнении с методами максимальной экономии и максимального правдоподобия, байесовский подход предоставляет три ключевых преимущества: прямой учёт филогенетической неопределённости, интеграцию априорных знаний и поддержку сложных эволюционных моделей, которые для традиционных методов сопряжены с серьёзными вычислительными ограничениями.

Применение байесовского подхода в филогенетике состоит в следующем: все допустимые филогенетические деревья  $T$  описываются дискретными параметрами  $\tau$  (топология деревьев) и непрерывными параметрами  $\alpha$  (длины ветвей деревьев и параметры эволюционной модели замен). Для вычисления значения апостериорной плотности распределения вероятностей  $f(T|B)$  для дерева  $T$  с топологией  $\tau_0$  и параметрами  $\alpha_0$ , при заданных исходных данных  $B$ , применяется формула Байеса  $f(T(\tau_0, \alpha_0)|B) = \frac{f(B|T)f(T)}{P(B)}$ , где  $f(B|T)$  — условная плотность распределения вероятностей исходных данных  $B$ . Знаменатель в этой формуле вычисляется по формуле полной вероятности в виде суммы по  $\tau$  интегралов от произведения  $f(T(\tau, \alpha))f(B|T(\tau, \alpha))$  по  $\alpha$ , где  $f(T(\tau, \alpha))$  — априорная плотность распределения для деревьев (Rannala, Yang 1996). Явные аналитические расчеты по этой формуле не всегда возможны, а численные — требуют большого количества вычислений при поиске максимума функции  $f(T|B)$  по  $T$ .

Применение метода статистических испытаний (метода Монте-Карло) на цепях Маркова дает возможность снизить вычислительную сложность алгоритма поиска наиболее правдоподобного дерева по критерию максимума апостериорной вероятности.

Апостериорная плотность в алгоритмах МСМС оценивается путём моделирования марковской цепи, состояния которой интерпретируются как филогенетические деревья. Расчёт сводится к определению частоты встречи этих состояний в стационарном режиме функционирования цепи. Дерево, обладающее наибольшей правдоподобностью, идентифицируется по максимуму частоты —

либо для одного наиболее часто посещаемого состояния, либо для набора таковых. Сам вычислительный процесс МСМС включает две последовательные операции: генерацию нового состояния цепи посредством стохастического механизма, после чего вычисляется вероятность соответствующего перехода и осуществляется случайное событие смены состояния. Цикл повторяется многократно — масштаб итераций варьируется от тысяч до миллионов. Итоговая доля времени пребывания отдельно взятого дерева в цепи марковского процесса служит точной оценкой его апостериорной вероятности. Наибольшее практическое распространение среди МСМС-алгоритмов получили: схема Метрополиса — Гастингса, гибридный метод Метрополиса с МСМС (обозначаемый МС<sup>3</sup>), а также алгоритм LOCAL, разработанный Ларгетом и Симоном (Metropolis et al., 1953, Larget, Simon, 1999).

**Статистический бутстрэп (бутстреп, бутстрэппинг, англ. bootstrap, bootstrapping)** — практический компьютерный метод исследования распределения статистик вероятностных распределений, основанный на многократной генерации выборок методом Монте-Карло на базе имеющейся выборки. Позволяет просто и быстро оценивать самые разные статистики (доверительные интервалы, дисперсию, корреляцию и так далее) для сложных моделей.

Впервые предложен в 1977 году Брэдли Эфроном (первая публикация относится к 1979 году). Суть подхода сводится к следующему: по исходной выборке строится эмпирическое распределение. Принимая это распределение за теоретическое, посредством датчика псевдослучайных чисел генерируется сколько угодно большое число псевдовыборок — их размер может быть произвольным, например равным объёму первоначальной выборки. На основе полученной совокупности псевдовыборок можно не только рассчитать анализируемые статистические показатели, но и изучить их вероятностные распределения. Это позволяет, в частности, оценивать дисперсию или квантили для любой статистики, какой бы сложной она ни была. Представленный метод относится к области непараметрической статистики (Efron, 1979)

В статистике метод оценки с помощью апостериорного максимума (MAP) связан с методом максимального правдоподобия (ML), но дополнительно при оптимизации использует априорное распределение величины, которую оценивает.

Предположим, что нам нужно оценить неконтролируемый параметр выборки

$\theta$  на базе наблюдений  $x$ . Пусть  $f$  - выборочное распределение  $x$ , такое, что

$f(x|\theta)$  - вероятность  $x$  в то время как параметр выборки

$\theta$ . Тогда функция  $\theta \mapsto f(x|\theta)$  известна как функция правдоподобия, а оценка  $\hat{\theta}_{ML}(x) = \arg \max_{\theta} f(x|\theta)$  как оценка максимального правдоподобия  $\theta$ . Теперь, предположим, что априорное распределение  $g$  на  $\theta$  существует. Это позволяет рассматривать  $\theta$  как случайную величину как в Байесовской статистике. тогда апостериорное распределение  $\theta$ :

$$\theta \rightarrow \frac{f(x|\theta)g(\theta)}{\int_{\Theta} f(x|\theta')g(\theta')d\theta'}, \text{ где } g \text{ плотность распределения } \theta, \Theta - \text{ область}$$

определения  $g$ . Это прямое приложение Теоремы Байеса.

Метод оценки максимального правдоподобия затем оценивает

$\theta$  как апостериорное распределение этой случайной величины:

$$\hat{\theta}_{MAP}(x) = \arg \max_{\theta} \frac{f(x|\theta)g(\theta)}{\int_{\Theta} f(x|\theta')g(\theta')d\theta'} = \arg \max_{\theta} f(x|\theta)$$

Знаменатель апостериорного распределения не зависит от  $\theta$  и поэтому не играет роли в оптимизации. Заметим, что MAP оценка  $\theta$  соответствует ML оценке, когда априорная  $g$  постоянна (т.е., константа). (DeGroot, Morris, 1970).

Реконструкцию филогенетических связей выполняли с использованием данных секвенирования рДНК *S. spasskii* и других видов трематод представленных в международном геномном банке.

Алгоритм филогенетического дерева MST – minimum spanning tree (Rohlf, 1973) основан на математической теории графов. Суть алгоритма заключается в построении мультирёберной структуры на основе теоретически ожидаемой минимальной структуры (подграфа), к которому постепенно в процессе построения дерева добавляется одна новая ветвь с минимальным весом

(дистанцией между парой объектов). Новая ветвь выбирается так, чтобы не нарушить исходную структуру реконструкции. В нашей работе реконструкция дерева MST проводилась в программе *Arlequin 3.11*, где используется алгоритм Крускала с модификацией Рольфа (Kruskal, 1956; Rohlf, 1973). Считается, что топология дерева, подобная MST, позволяет оценить межпопуляционные связи внутри вида более точно, чем традиционные кластерные методы, так как последние направлены в основном на оценку межвидовых филогенетических связей (Crandall, Templeton, 1996).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В данной главе представлены результаты морфологических и молекулярных исследований, а также результаты филогенетического анализа *Haploporidae*, отдельных представителей подсемейства *Waretrematinae* паразитирующих в кишечнике кефалевых рыб Дальнего Востока России и Вьетнама.

#### 3.1. Морфология, таксономия и систематика представителей рода

##### *Parasaccocoelium*

Род *Parasaccocoelium* Zhukov, 1971 был обоснован Жуковым в 1971 при описании нового вида *P. mugili* полученного от кефалей из залива Посъет, бассейн Японского моря и реки Ляохе, бассейн Желтого моря (Zhukov, 1971). Позже Оверстрит и Карран (Overstreet, Curran, 2005) включили трематод этого вида в состав рода *Pseudohapladena* Yamaguti, 1952 где этот вид и находился до наших исследований. Проведенные нами исследования как морфологии так и молекулярных особенностей трематод из кефалей ДВ России позволили реанимировать *Parasaccocoelium* с обоснованием новых видов в его составе. Ниже приведены результаты этих исследований.

**Тип:** Platyhelminthes Claus, 1887

**Класс:** Digenea Carus, 1863

**Отряд:** Plagiorchiida La Rue, 1957

**Подотряд:** Haploporata Pérez-Ponce de León et Hernández-Mena, 2019

**Семейство:** Haploporidae Nicoll, 1914

**Подсемейство** *Waretrematinae* Srivastava, 1937

Род *Parasaccocoelium* Zhukov, 1971

Типовой вид – *Parasaccocoelium mugili* Zhukov, 1971

##### Диагноз рода *Parasaccocoelium*

Тело овальное, веретенообразное или колбообразное, с втягивающимся задним концом, головной конец может втягиваться или нет. Глазные пятна диффузные. Ротовая присоска субтерминальная. Брюшная присоска больше ротовой, лежит на границе передней и средней третьей или в средней трети тела. Длина префаринкса и пищевода варьирует. Фаринкс поперечно-овальный или

округлый. Ветви кишечника короткие, мешковидные. Экскреторный пузырь Y-образный. Гермафродитная сумка мешковидная или овальная. Ее задний край не переходит уровня заднего края брюшной присоски. Половое отверстие перед брюшной присоской. Наружный семенной пузырек мешковидный, булабовидный или трубчатый. Семенник один, различной формы, продольно- или поперечно-овальный, неправильной формы, двулопастной или V-образный. Яичник состоит из крупных клеток, расположен чаще на медианной линии тела перед семенником, примыкая к нему или на некотором расстоянии от него. Яичник и семенник находятся в конце средней или задней трети тела. Желточники компактные, из крупных фолликул неправильной формы, которые плотно прилегают друг к другу; располагаются латерально, в интервале от переднего края брюшной присоски (реже – от фаринкса) до заднего края семенника. Желточные поля не соединяются. Матка короткая, на участке между задним концом гермафродитной сумки и середины семенника, содержит от одного до 12 яиц. Яйца с крышечками, светло-желтые, на стадии 1-2 зародышевых клеток. Развитие мирацидиев происходит вне матки червя, при попадании яиц в воду и завершается выходом мирацидиев из яиц. Мирацидии с пигментным пятном.

***Parasaccocoelium mugili Zhukov, 1971***

Синоним: *Pseudohapladena lizae* Liu et Yang, 2002

Типовой окончательный хозяин: *Planiliza haematocheilus* (пиленгас).

Другой окончательный хозяин: *Mugil cephalus* (лобан).

Локализация: кишечник.

Интенсивность инвазии: у пиленгаса от 1 до 254, у лобана – 1-10 червей.

Места обнаружения: Бассейн р. Раздольная (43°20'N, 131°47'E) река Карасик (42°32'N, 130°38'), река Киевка (42°52'N, 133°39'E).

Изученный материал: 15 экземпляров.

Описание (Рисунок 3; Таблица 7). Тело веретеновидное, от переднего конца до уровня середины последней трети покрыто мелкими шипиками. Во время фиксации или окраски шипы могут теряться. Задний конец тела вворачивается. В

этом случае тело становится пирамидальным (это характерно для живых червей). Глазные пятна в передней трети тела, диффузные. Ротовая присоска субтерминальная. Брюшная присоска больше ротовой, лежит на границе передней и средней или в начале средней трети тела. Префаринкс или очень короткий, или у большинства особей хорошо выражен и может достигать переднего края брюшной присоски. Фаринкс округлый или поперечно-овальный. Пищевод короткий, ветви кишечника мешковидные, оканчиваются около заднего края брюшной присоски или непосредственно за ним. Семенник один, продольно-овальный, округлый или поперечно-овальный неправильной формы. Гермафродитная сумка при дорзо-вентральном положении червя овальная или (реже) округлая, при латеральном положении – мешковидная, расположена дорзально от брюшной присоски. Ее задний конец не пересекает уровень заднего края брюшной присоски. Половое отверстие с мышечным сфинктером, на средней линии тела сразу перед брюшной присоской. Гермафродитная сумка имеет внутренний семенной пузырек и немного простатических клеток. Наружный семенной пузырек, в зависимости от наполненности половыми продуктами не достигает (у большинства червей) или достигает семенника и яичника. Яичник округлый или овальный, обычно примыкает к семеннику, но реже лежит на некотором расстоянии перед ним, как на средней линии тела, так справа или слева от нее (у трех экземпляров яичник находится на уровне заднего края семенника). Тельце Мелиса из 6-8 клеток. Желточник состоит из пары латеральных компактных групп крупных фолликул, которые имеют неправильную форму. Мелкие черви имеют по 6 фолликул в каждой группе, и они хорошо заметны. Большие черви имеют более крупные фолликулы, и последние сливаются так, что границы между фолликулами не различимы. Желточные поля могут иметь вид гомогенной массы из желточных клеток, что связано с разрушением стенок фолликул при изготовлении препаратов.

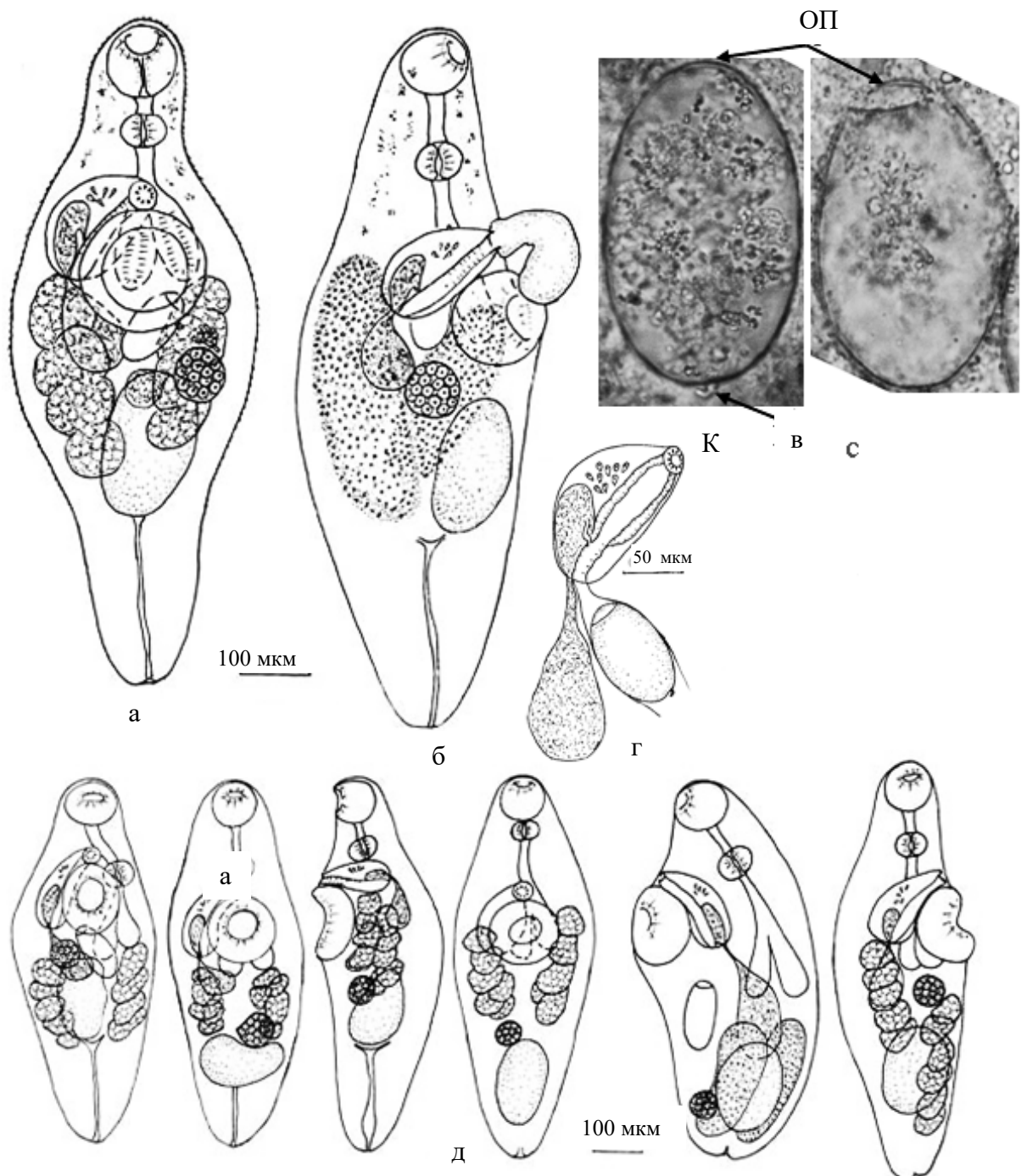


Рисунок 3. *Parasaccocoelium mugili* Zhukov, 1971: а - вентрально; б - латерально; в - яйца с оперкулумом (ОП) и крючком (К); г - гермафродитная сумка; д - вариации расположения органов.

Желточник расположен в промежутке между передним краем брюшной присоски и задним краем семенника (редко несколько далее заднего края семенника) и частично покрывает яичник и семенник. Желточные поля не соединяются. Яичник, семенник и желточники у большинства червей располагаются в интервале середина-начало задней трети тела, но у некоторых

экземпляров помещаются в задней трети тела, и в этих случаях семенник может прилегать к заднему концу тела. Матка короткая, между гермафродитной сумкой и передним краем семенника (Рисунок 3). Она содержит одно крупное светло-желтое яйцо с крышечкой на одном конце и изогнутым отростком на противоположном конце (только у одного червя матка содержала 4 яйца) В яйце 1-2 зародышевые клетки и немногочисленные крупные желточные клетки. Экскреторный пузырь Y-образный. Развитие мирацидия происходит после попадания яйца в воду в течение 14 дней при температуре 20-24 градуса. Мирацидий имеет глазное пятно и реснички на поверхности тела, которые обеспечивают ему активное перемещение после выхода из яйца в воду.

**Примечание.** В 1971 г. Жуков обнаружил в кишечниках пиленгасов из Японского и Желтого морей новый вид трематод из семейства Harporidae (Waretrematinae) и основал для этих червей новый род *Parasaccocoelium* с единственным видом *P. mugili*. В 2005 г. Оверстрит и Карран (Overstreet, Curran, 2005) провели ревизию семейства Harporidae, и одним из результатов ее стало сведение рода *Parasaccocoelium* в младшие синонимы рода *Pseudohapladena* (Overstreet, Curran, 2005). В последний род, помимо *P. mugili* они перевели *Saccocoelioides martini* Madchavi, 1980, *S. pearsoni* Martin, 1973 и *S. huidongensis* Лу, 1993. Эти виды были отнесены к *Pseudohapladena*, поскольку они имеют префаринкс более длинный, чем фаринкс, короткие кишечные ветви, прилегающие друг к другу яичник и семенник и удлиненные желточные поля.

Как считают Оверстрит и Карран (2005), род *Pseudohapladena* включает 7 видов – типовой вид *P. scatophagi* Yamaguti, 1952 and *P. mugili* (Zukhov, 1971), *P. pearsoni* (Martin, 1973), *P. martini* (Madchavi, 1979), *P. huidongensis* (Lu, 1993), *P. megaorchis* Liu et Yang, 2002 и *P. lizae* Liu et Yang, 2002.

По нашему мнению система семейства Harporidae (в частности – система подсемейств Chalcinotrematinae и Waretrematinae) далека от идеала, о чем также упоминали Оверстрит и Карран, несмотря на проведенную ими ревизию семейства. В частности они указывали на необходимость новых данных для ревизии выделяемого ими комплекса *Pseudohapladena* (рода *Pseudohapladena*,

*Skrjabinolecithum*, *Platydidymus*). Анализ диагнозов ряда родов из Chalcinotrematinae и Waretrematinae показал невозможность уверенной дифференциации многих описанных и новых видов. Во многих случаях для определения систематического статуса рода или вида Оверстрит и Карран используют признаки, которые являются крайне вариабельными среди представителей Harpororidae (длина префаринкса, отношение длины префаринкса и фаринкса, форма кишечных ветвей и гермафродитной сумки, незначительные различия в длине кишечных ветвей, положение яичника и семенника относительно конца кишечных ветвей и т.д.). Мы можем судить о высокой изменчивости этих признаков на примере *Parasaccocoelium mugili* (Рисунок 4) и новых видов, описанных ниже.

Наиболее стабильными признаками *Parasaccocoelium* являются: положение желточных полей (латерально в зоне средней и задней трети тела), отсутствие их соединения позади семенника, наличие отдельных некрупных фолликул желточника, короткая матка с несколькими яйцами и развитие мирацидия в воде. В тоже время Типовой вид *Pseudohapladena*, *P. scatophagi*, также как *P. martini* и *P. megaorchis* имеют желточник, поля которого соединяются позади семенника, вытянутые желточные фолликулы, длинную матку с многочисленными мелкими яйцами (Yamaguti 1952, Zhukov 1971 Madhavi 1979, Liu, Yang 2002). Исходя из этих показателей *Parasaccocoelium mugili* не может быть в составе рода *Pseudohapladena*, так как соответствует диагностическим критериям *Parasaccocoelium* Zhukov 1971. Что касается *Pseudohapladena pearsoni* Martin, 1973, то вид как следует из описания Мартина (1973), является нетипичным представителем рода. Его особи имеют желточники, которые лежат в интервале от гермафродитной сумки до заднего конца семенника и состоят из немногочисленных редко расположенных фолликул. Представители вида *P. pearsoni* также отличаются от типового вида *Pseudohapladena* короткой маткой с немногочисленными яйцами. По большинству признаков помимо расположения желточных фолликул этот вид сходен с видами из рода *Parasaccocoelium*. Однако

мы воздерживаемся от изменения его родовой принадлежности до получения для вида новых морфологических и первых молекулярных данных.

Особи вида *Pseudohapladena lizae*, описанного Лю и Янгом (Liu, Yang 2002) от *Planiliza carinatus* Valenciennes 1836, по морфологии и размерам метрическим показателям идентичны с *Parasaccocoelium mugili* (Рисунок 3, Таблица 6). Исходя из этих данных, мы считаем, что этот вид является младшим синонимом *P. mugili*.

***Parasaccocoelium haematocheilum* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko,  
Nikitenko (Beloded), 2014**

*Типовой окончательный хозяин:* *Planiliza haematocheilus* (пиленгас).

*Локализация:* кишечник.

*Интенсивность инвазии:* 1-10 червей.

*Типовое местообитание:* бассейн р. Раздольная, 43°20'N, 131°47'E.

*Исследованный материал:* 12 экземпляров.

*Описание* (Рисунок 4 а-в, Таблица 7). Тело овальное. Кутикулярные шипики были найдены только перед отверстием ротовой присоски и вокруг отверстия брюшной присоски. Пигментные глазки в основном на переднем конце тела, но маленькие пигментные пятна имеются и в средней трети тела. Ротовая присоска субтерминальная. Префаринкс короткий. Фаринкс поперечно-овальный. Пищевод короткий. Ветви кишечника мешковидные, заканчиваются около заднего края брюшной присоски. Брюшная присоска больше ротовой, лежит на границе передней и средней третей тела. Семенник поперечно- или продольно-овальный, из двух равных или неравных долей. Гермафродитная сумка овальная при дорзо-вентральном положении червя и мешковидная при латеральном положении, располагается дорзально от брюшной присоски. Задний край гермафродитной сумки не пересекает уровень заднего края брюшной присоски. Гермафродитная сумка имеет внутренний семенной пузырек и немногочисленные простатические клетки. Наружный семенной пузырек мешковидный, доходит до семенника или, наиболее часто, лежит на уровне яичника и семенника. Половое отверстие с мышечным сфинктером находится на средней линии тела непосредственно перед

брюшной присоской. Яичник округлый или овальный, прилегает к семеннику или находится на некотором расстоянии от него на средней линии тела или справа от нее на уровне семенника. Тельце Мелиса имеется.

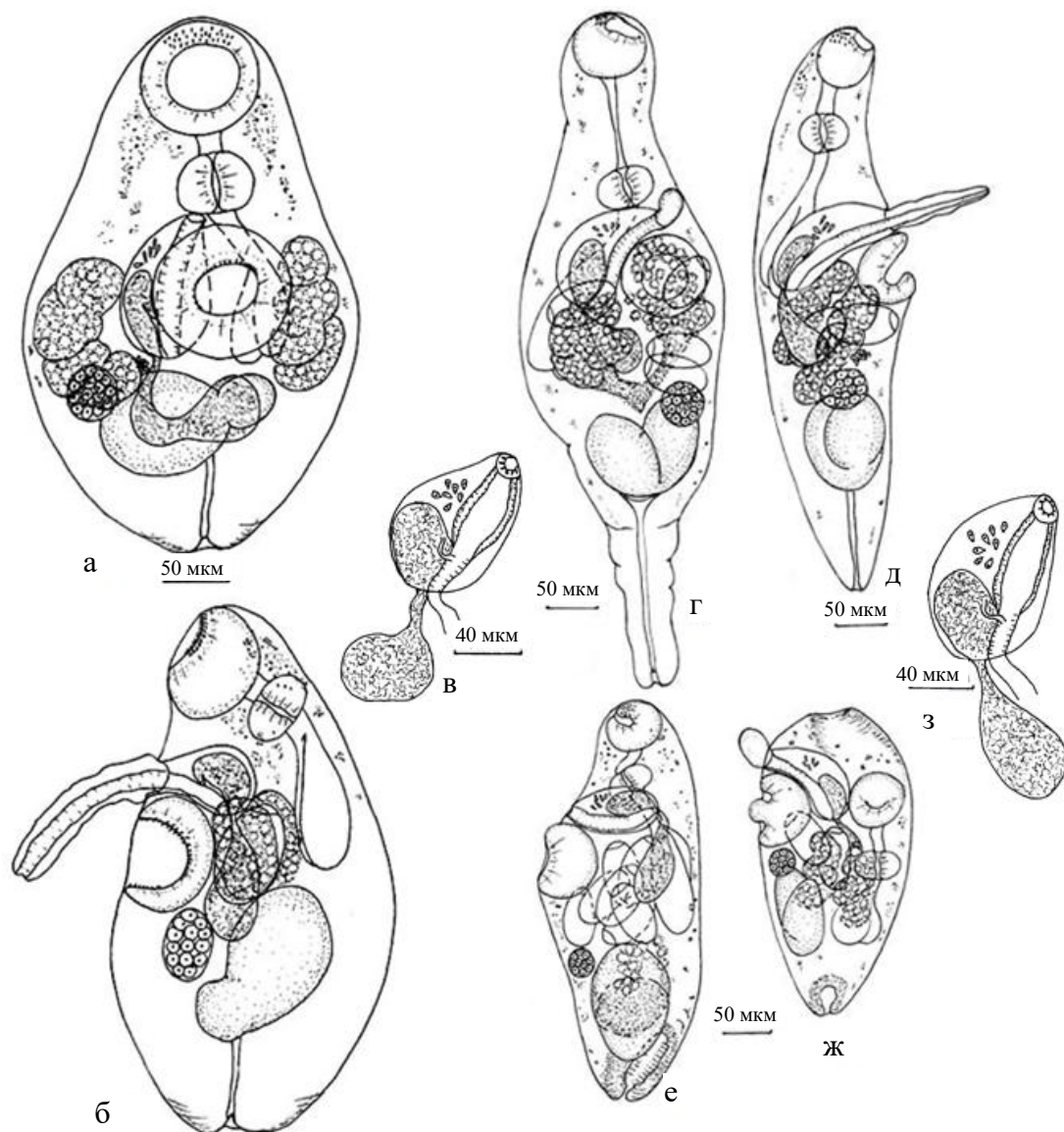


Рисунок 4 а-в. *Parasaccocoelium haematocheilum*: а - вентрально; б - латерально; в - гермафродитная сумка. Рисунок 4 г-з. *Parasaccocoelium polyovum*: г - вентрально; д - латерально; е - втянутый задний конец тела; ж - втянутый передний конец тела; з - гермафродитная сумка

Желточники из 2 латеральных полей с 4-5 компактными фолликулами каждое, располагаются в промежутке от переднего края брюшной присоски до заднего края семенника и частично прикрывают яичник и семенник. Желточные поля не соединяются. Яичник, семенник и желточники в большинстве случаев

располагаются на уровне в передней половине задней трети тела. Матка короткая, ограничена гермафродитной сумкой и передним краем семенника, содержит 1-4 яйца. Она содержит одно крупное светло-желтое яйцо с крышечкой на одном конце и изогнутым отростком на противоположном конце (только у одного червя матка содержала 4 яйца) В яйце 1-2 зародышевые клетки и немногочисленные крупные желточные клетки. Экскреторный пузырь Y-образный. Развитие мерицидия происходит после попадания яйца в воду в течение 14 дней при температуре 20-24 градуса.

**Примечание.** Морфологические признаки вида находятся в соответствии с родовым диагнозом. От типового вида *Parasaccocoelium mugili* они отличаются меньшими минимальными, максимальными и средними размерами тела, яиц и почти всех органов (Таблица 7), а также двулопастным семенником и количеством яиц в матке (1-4 яиц у *P. haematocheilum*, в подавляющих случаях, 1 яйцо у *P. mugili*).

***Parasaccocoelium polyovum* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko,  
Nikitenko (Beloded), 2014**

*Типовой окончательный хозяин: Planiliza haematocheilus.* (пиленгас)

*Другой окончательный хозяин: Mugil cephalus* (лобан).

*Локализация:* кишечник.

*Интенсивность инвазии:* 21-104 червей у пиленгаса, 18 – у лобана.

*Типовое местообитания:* бассейн река Раздольная, 43°20'N, 131°47'E;

*Иное место обнаружения:* река Киевка, 42°52'N, 133°39'E.

*Исследованный материал:* 34 экземпляра.

*Описание* (Рисунок 4 г-з, Таблица 7). Тело веретеновидное или овальное с вытягивающимся передним концом и вворачивающимся задним. Кутикулярные шипики найдены только на переднем конце тела. Глазные пятна диффузные. Пигментные гранулы находятся по всей длине тела. Ротовая присоска субтерминальная. Префаринкс обычно хорошо развит. Фаринкс поперечно-овальный, пищевод короткий, кишечные ветви мешковидные, заканчиваются

около заднего края брюшной присоски. Брюшная присоска равна или немного больше ротовой, лежит на границе передней и средней трети тела или в начале средней трети. Семенник V-образный. Гермафродитная сумка мешковидная, лежит дорзально от брюшной присоски, имеет внутренний семенной пузырек и немногочисленные простатические клетки. Задний край гермафродитной сумки не пересекает уровень заднего края брюшной присоски. Наружный семенной пузырек в зависимости от количества половых продуктов достигает или не достигает яичника и семенника и может быть трубчатым или мешковидным. Половое отверстие с мышечным сфинктером находится непосредственно перед брюшной присоской. Яичник округлый или овальный, расположен на уровне переднего края семенника на медианной линии тела или слева от нее. Желточники представляют собой два латеральных не соединяющихся поля из компактно упакованных фолликул различной формы, которые лежат в интервале от переднего края брюшной присоски до середины семенника и могут частично покрывать яичник и семенник. Яичник, семенник и желточники находятся в передней половине задней трети тела. Матка короткая, от гермафродитной сумки до переднего края семенника (когда в ней до 7 яиц) или до задней границы семенника (когда в ней 12 яиц). Яйца овальные, с крышечкой, светло-желтые. Экскреторный пузырь Y-образный.

**Примечание.** Описываемый вид, как и предыдущие, принадлежит к роду *Parasaccocoelium*, но отличается от них по ряду признаков. Особи *Parasaccocoelium polyovum* отличаются от *P. mugili* меньшими максимальными и средними размерами тела и большинства органов (присосок, фаринкса, яичника, семенника) и меньшими размерами яиц (Таблица 4). По сравнению с *P. haematocheilum* и *P. armatum* они имеют меньше метрических различий, чем от *P. mugili* (Таблица 7). Взрослые *Parasaccocoelium polyovum* имеют бóльшие максимальные и средние размеры длины тела и гермафродитной сумки, меньшие максимальные и средние размеры ротовой присоски, тогда как желточные поля у них менее длинные и более широкие, чем у *P. haematocheilum*. Черви *P. polyovum* отличаются от *Parasaccocoelium armatum* бóльшими максимальными и средними

размерами длин тела и семенника, но меньшей их шириной, более длинной гермафродитной сумкой, меньшими размерами присосок и яиц. Кроме этого, *Parasaccocoelium polyovum* отличается от *P. mugili* и *P. haematocheilum* наличием V-образного семенника, а также как и от *P. armatum* наличием в матке до 12 яиц и расположением пигментных пятен по всей длине тела.

Подводя итог данным полученным для выше описанных червей, мы считаем род *Parasaccocoelium*, обоснованный Жуковым, валидным и его представители не могут быть причислены роду *Pseudohapladena* Yamaguti, 1952, Синонимизация родов была осуществлена Overstreet, Curran (2005) с чем мы не согласны по причине того, что имеются значимые морфологические различия между трематодами этих родов. Виды *Parasaccocoelium*, как по данным Жукова, так и нашим данным, отличаются от видов *Pseudohapladena* наличием и отсутствием пигментных глазков, положением ротовой присоски (субтерминально против терминально), структурой семенника (продольно-овальный, круглый, поперечно-овальный, двудольчатый или V-образный против субсферического имеющего неправильную или удлинённую форму). Кроме того, желточник состоит из крупных компактных фолликул неправильной формы, которые простираются между передним краем вентральной присоски или глотки и задним краем семенника и не занимают область позади семенника против желточника, представленного удлинёнными фолликулами, простирающимися до заднего конца тела. Дополнительно мигриций с пигментным глазком у видов рода *Parasaccocoelium* против мигриций рода *Pseudohapladena*, не имеющих пигментного глазка. С учетом этих различий мы восстанавливаем род *Parasaccocoelium* с типовым видом *P. mugili* (Besprozvannykh et al., 2015).

Таблица 6. Сравнительная морфометрия (мкм) *Parasaccocoelium mugili* Zhukov, 1971 и *Pseudohapladena lizae* Liu, Yang, 2002, с диапазонами, средними значениями и коэффициентами вариации (CV) длины (первые значения) и ширины (вторые значения); n = количество исследованных образцов

| Характеристика                                   | <i>Parasaccocoelium mugili</i>    |            |                    |                   | <i>Pseudohapladena lizae</i> |           |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|--------------------|-------------------|------------------------------|-----------|
|                                                  | Образцы исследованные нами (n=15) |            | По Zhukov (1971)   |                   | По Liu, Yang (2002)          |           |
|                                                  | Средние значения                  | CV         | Диапазон           | Диапазон          | Диапазон                     | Диапазон  |
| Тело                                             | 756 x 309                         | 16.7; 15.9 | 590-1020 x 220-430 | 470-940 x 140-460 | 616-1116 x 224-360           | 809 x 292 |
| Соотношение длины и ширины                       | 1:2.45                            | —          | 1:2.0-2.95         | —                 | —                            | —         |
| Ротовая присоска                                 | 89 x 86                           | 10.7; 21.8 | 70-154 x 61-110    | 62-120 x 71-83    | 60-112 x 94-124              | 88 x 103  |
| От переднего конца тела до брюшной присоски      | 230                               | 27.8       | 120-358            | —                 | —                            | —         |
| Брюшная присоска                                 | 145 x 132                         | 14.3; 21.6 | 110-189 x 110-185  | 62-200 x 92-120   | 74-150 x 78-162              | 106 x 115 |
| Соотношение длины присоски                       | 1:0.60                            | —          | 1:0.45-0.82        | —                 | 1:0.7-1:0.96                 | 1:0.78    |
| Соотношение ширины присоски                      | 1:0.72                            | —          | 1:0.54-0.98        | —                 |                              |           |
| Длина префаринкса                                | 45                                | 71.0       | 12-89              | —                 | 10-50                        | 29        |
| Глотка                                           | 47 x 62                           | 17.0; 10.5 | 31-58 x 53-81      | 37-71 x 41-66     | 36-58 x 38-70                | 50 x 53   |
| Длина пищевода                                   | 50                                | 25.4       | 39-69              | 46-102            | 100-290                      | 173       |
| Длина кишки                                      | 145                               | 23.4       | 85-177             | 66-96             | 64-126                       | 96        |
| Яичник                                           | 62 x 61                           | 21.9; 14.3 | 39-85 x 50-78      | 46-140 x 33-130   | 60-114 x 44-112              | 86 x 65   |
| Семенник                                         | 153 x 122                         | 25.8; 26.2 | 100-231 x 90-200   | 150-230 x 48-100  | 166-268 x 90-188             | 216 x 131 |
| Гермафродитная сумка                             | 177 x 92                          | 19.7; 32.6 | 120-239 x 56-170   | 87-160 x 54-96    | 106-172 x 74-152             | 132 x 93  |
| Желточные области                                | 300 x 121                         | 37.1; 20.9 | 123-439 x 77-173   | 188-274 x 58-104  | —                            | —         |
| Расстояние от переднего конца тела до яичника    | 409                               | 17.2       | 300-523            | —                 | —                            | —         |
| Расстояние от переднего конца тела до желточника | 308                               | 38         | 210-400            | —                 | —                            | —         |
| Расстояние от заднего конца тела до желточника   | 196                               | 31         | 110-273            | —                 | —                            | —         |
| Расстояние от заднего конца тела до семенника    | 168                               | 42.7       | 72-296             | —                 | —                            | —         |
| Яйца                                             | 92 x 59                           | 9.7; 9.5   | 89-103 x 54-69     | 87-100 x 41-62    | 64-82 x 42-64                | 74 x 51   |

Таблица 7. Сравнительные морфометрические характеристики (мкм) *Parasaccocoelium haematocheilum* и *Parasaccocoelium polyovum* и *Parasaccocoelium armatum* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen 2020 с диапазонами, средними значениями и коэффициентами вариации (CV) длины (первые значения) и ширины (вторые значения); n = количество исследованных образцов

| Характеристика                              | <i>Parasaccocoelium haematocheilum</i> |                  |            |                   | <i>Parasaccocoelium polyovum.</i> |                  |            |                   | <i>Parasaccocoelium armatum</i> ( по Atopkin et al., 2019) |                  |          |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|------------------|------------|-------------------|-----------------------------------|------------------|------------|-------------------|------------------------------------------------------------|------------------|----------|
|                                             | n= 12                                  |                  |            |                   | n= 10                             |                  |            |                   | n = 5                                                      |                  |          |
|                                             | Голотип                                | Средние значения | CV         | Диапазон          | Голотип                           | Средние значения | CV         | Диапазон          | Голотип                                                    | Средние значения | Диапазон |
| Тело                                        | 393 x 250                              | 384 x 199        | 13.0; 16.0 | 308-466 x 158-227 | 677 x 215                         | 521 x 168        | 27.4; 24.0 | 327-832 x 146-262 | 955x200                                                    | 909x223          | 955-246  |
| Соотношение длины и ширины                  | 1.58:1                                 | 1.95:1           | –          | 1.57-2.31:1       | 3.15:1                            | -                | -          | -                 | -                                                          | -                | -        |
| Ротовая присоска                            | 85 x 85                                | 76 x 63          | 17.9; 22.0 | 54-96 x 50-85     | 62 x 73                           | 59 x 59          | 12.4; 10.5 | 50-77 x 60-85     | 81                                                         |                  | 58-89    |
| От переднего конца тела до брюшной присоски | 154                                    | 141              | 14.9       | 119-154           | 219                               | 168              | 26.8       | 123-269           | -                                                          | -                | -        |
| Брюшная присоска                            | 96 x 96                                | 94 x 96          | 3.9; 3.8   | 89-100 x 92-100   | 85 x 85                           | 70 x 73          | 18.0; 10.5 | 58-92 x 58-92     | 96                                                         | 87-89            | 73-100   |
| Соотношение длины присоски                  | 1:0.88                                 | 1:0.81           | –          | 1:0.59-1.0        | 1:0.73                            | 1:0.84           | –          | 1:0.73-1.20       | 96                                                         | 87               | 73-100   |
| Соотношение ширины присоски                 | 1: 0.88                                | 1:0.69           | –          | 1:0.50-0.88       | 1:0.86                            | 1:0.81           | –          | 1:0.74-1.06       | 96                                                         | 89               | 77-100   |
| Длина префаринкса                           | 12                                     | 15               | 64.6       | 6-31              | 92                                | 46               | 57.0       | 19-92             | 100                                                        | 35-131           | 88       |
| Глотка                                      | 50 x 58                                | 40 x 57          | 11.8; 10.5 | 35-50 x 46-62     | 39 x 58                           | 37 x 48          | 13.5; 13.5 | 27-42 x 39-58     | 39                                                         | 27-39            | 31       |
| Длина пищевода                              | 51                                     | 35               | 51.0       | 11-52             | 39                                | 36               | 21.9       | 27-46             | -                                                          | -                | -        |
| Длина кишки                                 | 65                                     | 71               | 23.5       | 52-100            | 135                               | 101              | 19.4       | 77-135            | 227                                                        | 81-227           | 149      |
| Яичник                                      | 39 x 35                                | 48 x 42          | 33.3; 18.0 | 23-73 x 35-58     | 42 x 39                           | 36 x 39          | 22.2; 25.4 | 23-50 x 27-58     | 58x62                                                      | 58-77x46-73      | 64x57    |
| Семенник                                    | 69 x 116                               | 99 x 84          | 27.0; 37.0 | 69-142 x 54-135   | 96 x 108                          | 125 x 82         | 32.5; 27.0 | 85-223 x 58-123   | 169x123                                                    | 162-200x112-123  | 171x132  |

Таблица 7. Окончание

|                                                  |                 |          |               |                    |                    |          |               |                    |             |                         |         |
|--------------------------------------------------|-----------------|----------|---------------|--------------------|--------------------|----------|---------------|--------------------|-------------|-------------------------|---------|
| Гермафродитная сумка                             | 100 x 65        | 101 x 68 | 20.4;<br>15.9 | 77-131 x<br>54-85  | 116 x 77           | 119 x 70 | 21.5;<br>21.4 | 96-173 x<br>50-96  | 181x81      | 181-<br>210x77-85       | 200x80  |
| Желточные области                                | 116-123<br>x 69 | 158 x 52 | 11.2;<br>15.0 | 135-177 x<br>58-77 | 104-108<br>x 77-92 | 123 x 72 | 13.0;<br>21.5 | 104-146 x<br>50-96 | 192x169     | 162-<br>262x169-<br>204 | 207x198 |
| Расстояние от переднего конца тела до яичника    | 250             | 232      | 12.9          | 193-281            | 385                | 304      | 16.0          | 273-338            | -           | -                       | -       |
| Расстояние от переднего конца тела до желточника | 166             | 160      | 22.0          | 116-227            | 216                | 220      | 11.8          | 193-266            | -           | -                       | -       |
| Расстояние от заднего конца тела до желточника   | 104             | 122      | 19.3          | 89-162             | 304                | 220      | 39.5          | 112-404            | -           | -                       | -       |
| Расстояние от заднего конца тела до семенника    | 65              | 71       | 7.7           | 65-77              | 193                | 126      | 74.0          | 42-339             | -           | -                       | -       |
| Яйца                                             | —               | 85 x 49  | 8.0;<br>14.4  | 73-92 x<br>42-58   | —                  | 77 x 45  | 9.4;<br>9.8   | 61-85 x<br>39-50   | 65-69x35-39 | 65-69x35-<br>39         | -       |

## Таксономия и филогенетические связи видов *Parasaccocoelium* по результатам молекулярных исследований

В данном разделе представлены результаты таксономических исследований видов рода *Parasaccocoelium*, проведенных на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 28S рРНК длиной 1139 п.н. (*P. polyovum*) - 1143 п.н. (*P. mugili*, *P. haematocheilum*). Разная длина последовательностей фрагмента гена 28S рРНК обусловлена тетрамерной делецией у *P. polyovum* в позиции 407-410 п.н., что подтверждено результатами теста на анцестральную последовательность (вероятность более 90%) (Таблица 8). Генетическая дифференциация между видами рода *Parasaccocoelium* варьировала от 0.73% (*P. mugili*/*P. haematocheilum*) до 3.1% (*P. haematocheilum*/*P. polyovum*). Филогенетические реконструкции, построенные с помощью алгоритма Байеса, показали монофилию рода *Parasaccocoelium*, который оказался ближе к представителям рода *Elonginurus* (подсем. Waretrematinae). Внутри клады, представляющей род *Parasaccocoelium* сестринскими по отношению друг к другу оказались виды *P. mugili* и *P. haematocheilum* с одной стороны, и *P. armatum* и *P. polyovum* – с другой (Рисунок 5). Генетическая дифференциация между видами внутри рода *Parasaccocoelium* соответствует таковой для других родов сем. Harpororidae. Так, например, для рода *Saccocoelium*, представителя подсемейства Harpororinae, диапазон значений внутриродовой дифференциации так же варьируется от 0.9% до 4.44% (Blasco-Costa et al., 2009). Таким образом, по молекулярным данным подтверждена принадлежность рода *Parasaccocoelium* к подсем. Waretrematinae и обоснованность видов *P. mugili*, *P. haematocheilum* и *P. polyovum* в составе этого рода.

Таблица 8. Анцестральные состояния варьируемых сайтов в последовательностях 28S рДНК для видов рода *Parasaccocoelium* с вероятностью вывода > 90%

| № нуклеотидного сайта | Вид                                            |                    |
|-----------------------|------------------------------------------------|--------------------|
|                       | <i>P. mugili</i> ,<br><i>P. haematocheilum</i> | <i>P. polyovum</i> |
| 407                   | T                                              | T → X              |
| 408                   | C                                              | C → X              |
| 409                   | G                                              | G → X              |
| 410                   | G                                              | G → X              |

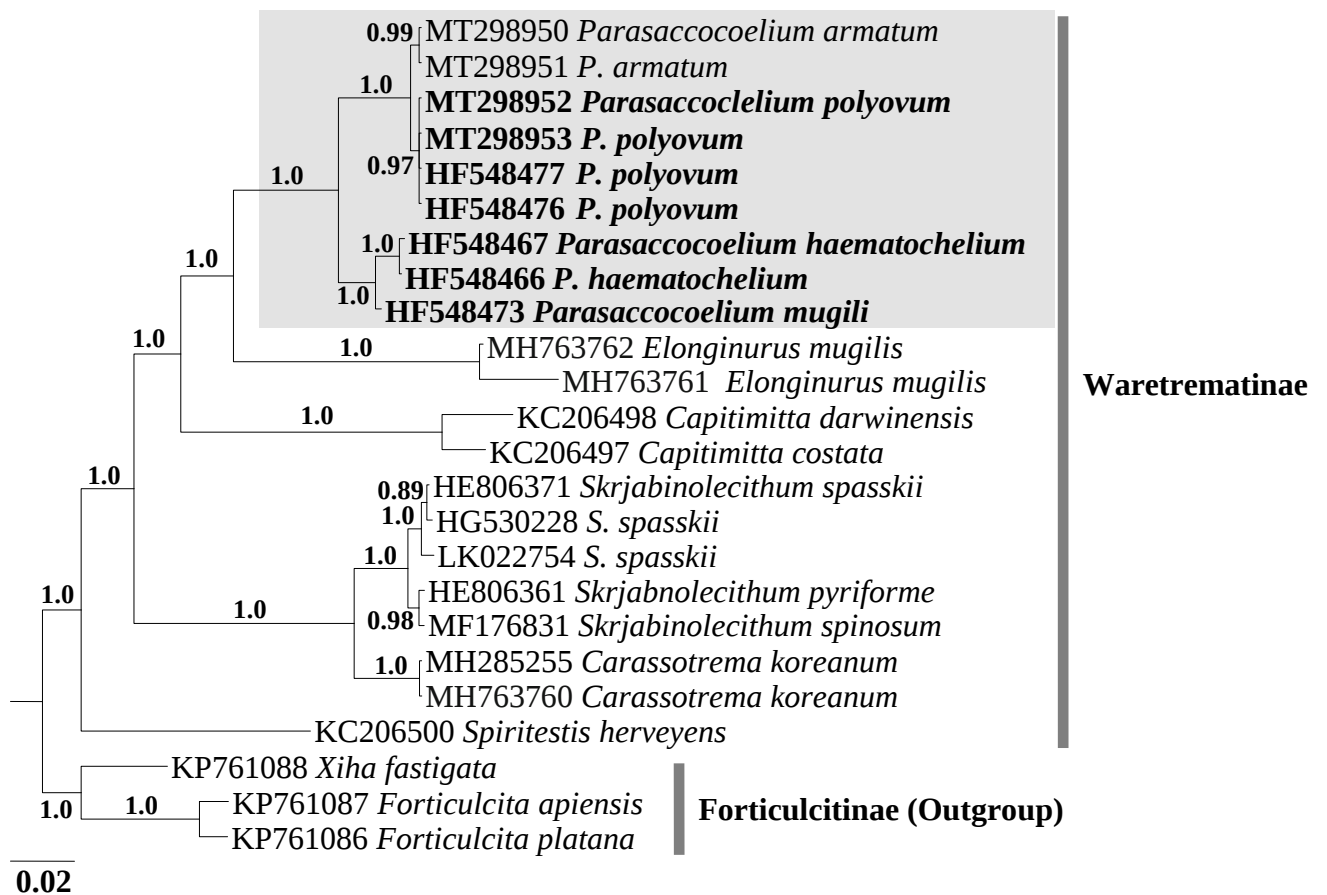


Рисунок 5. Фрагмент филогенетического дерева семейства Haploporidae, реконструированного на основе частичных последовательностей 28S рДНК с использованием Байесовского алгоритма. Узловые числа указывают на апостериорные вероятности. Описанные и обоснованные виды *Parasaccocoelium* выделены жирным.

### 3.2. Морфология, таксономия и систематика представителей рода *Skrjabinolecithum*

Род *Skrjabinolecithum* Belous, 1954 сем. Haploporidae был основан Белоус (1954), описавшей трематод, названных ею *Skrjabinolecithum spasskii*, от пиленгаса *Mugil soiuu* (сейчас *Planiliza haematocheilus* (Temminck, Schlegel)) из р. Раздольная (=Суйфун) на юге российского Дальнего Востока. В 2005 г. в этот род были включены еще три вида *Skrjabinolecithum indicum* (Zhukov, 1972) Overstreet, Curran, 2005, *Skrjabinolecithum vitellosum* (Martin, 1973) Overstreet, Curran, 2005 и *Skrjabinolecithum bengalense* (Madhavi, 1980) Overstreet Curran, 2005, паразитирующих на морских и эстуарных рыбах Восточного полушария.

Мы обнаружили половозрелых трематод *S. spasskii* у пиленгаса *Planiliza haematocheilus* и лобана *Mugil cephalus* Linneaus, 1758 из типового местообитания и соседних рек. Кроме того, мы нашли этих червей у *M. cephalus* из Тонкинского залива (северный Вьетнам). Исследование большого числа червей показало, что в первоописании вида были допущены неточности, касающиеся яиц, формы семенника и длины кишечных ветвей.

К сожалению, Белоус не обозначила голотип и не указала депозитарий, куда она поместила описанных ею червей. Наши попытки найти типовой экземпляр для изучения оказались безуспешными. В связи с этим мы выделили неотип, провели переописание *S. spasskii* и с учетом новых морфологических данных сформировали диагноз рода и выявили два новых вида. Для подтверждения валидности обнаруженных трематод были проанализированы их нуклеотидные последовательности гена 28S рРНК и фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 рибосомальной ДНК ядерного генома этих видов.

#### **Род: *Skrjabinolecithum***

**Типовой вид:** *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954

#### **Диагноз рода**

Тело веретеновидное, овальное или удлиненное, покрыто мелкими шипиками. Пигментные глазки диффузные, расположены в передней трети тела. Ротовая присоска субтерминальная, префаринкс короткий, фаринкс округлый или поперечноовальный, пищевод длиннее префаринкса, кишечные ветви широкие, длинные достигают заднего края семенника или середины посттестикулярного пространства. Брюшная присоска соответствует ротовой или больше, находится на границе передней и средней трети тела. Семенник одиночный, V – образный, позади брюшной присоски, в конце середины начала задней трети тела или конце средней трети. Гермафродитная сумка овальная или мешковидная, позади брюшной присоски. Половое отверстие располагается на средней линии непосредственно перед брюшной присоской. Яичник округлый, поперечно или продольно овальный прилегает к переднему краю семенника. Желточники

лентовидные, состоят из мелких, круглых, плотно прилегающих друг к другу фолликул. Желточные поля располагаются от уровня середины брюшной присоски до середины задней трети тела или немного дальше, сливаясь на медианной линии и прикрывают яичник, семенник и кишечные ветви. Матка короткая находится между гермафродитной сумкой и передним краем семенника. Яйца некрупные светло-желтые имеют крышечку и изогнутый шифтик. Экскреторный пузырь Y или I-образный.

### ***Skrjabinolecithum spasskii*, Belous, 1954**

*Типовой хозяин: Planiliza haematocheilus* (пиленгас)

*Другой хозяин: Mugil cephalus* (лобан).

*Типовое местообитание:* бассейн реки Раздольная, 43°20'N, 131°47'E;

*Иные места обнаружения:* река Киевка, 42°52'N, 133°39'E, река Карасик 42°32'N, 130°38'E, Тонкинский залив (о. Кат Ба, Вьетнам) 20°81'N, 106°59'E

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* пиленгас 6-112 трематод, лобан 8-40 трематод.

*Исследованный материал:* 27 экземпляров

*Описание взрослого червя* (Рисунок 6, Таблица 9). Тело веретеновидное, от переднего конца до задней трети покрыто мелкими шипиками (при фиксации червей и изготовлении постоянных препаратов шипики могут быть утрачены). Глазные пятна диффузные, расположены в передней трети тела. Ротовая присоска субтерминальная, префаринкс короткий, фаринкс округлый или поперечноовальный, пищевод у большинства особей в два - четыре раза длиннее префаринкса и может достигать уровня середины брюшной присоски, кишечные ветви широкие, длинные немного не достигают заднего конца тела. У большинства особей достигших половой зрелости они заканчиваются на уровне заднего края желточников. Брюшная присоска больше ротовой, находится на границе передней и средней трети тела. Семенник один, V – образный, находится сзади брюшной присоски, обычно в конце середины начала задней трети тела.

Гермафродитная сумка при дорзо-вентральном расположении червя овальная, при латеральном – мешковидная. Она находится дорсально от брюшной присоски, которая частично ее прикрывает. Задний край гермафродитной сумки не выходит за границу заднего края брюшной присоски. Половое отверстие располагается на средней линии непосредственно перед брюшной присоской. Половое отверстие и задний конец сумки снабжены мышечными сфинктерами. В гермафродитной сумке имеются внутренний семенной пузырек и немногочисленные простатические клетки. Наружный семенной пузырек мешковидный и, в зависимости от наполненности половыми продуктами, у большинства исследованных особей достигает, у некоторых может не достигать уровня яичника или переднего края семенника. Яичник округлый, или продольно овальный прилегает к переднему краю семенника слева от медианной линии. Имеется тельце Меллиса, которое состоит из 8-9 некрупных клеток. Желточники лентовидные, состоят из мелких, круглых, плотно прилегающих друг к другу фолликул. Желточные поля располагаются от уровня середины брюшной присоски до середины задней трети тела или немного дальше. Левое и правое поля желточников сливаются на медианной линии и прикрывают яичник, семенник и кишечные ветви. Матка короткая ограничена в переднезаднем направлении гермафродитной сумкой и передней границей семенника (Рисунок 6). В матке от 3 до 33 яиц. Яйца некрупные светло-желтые имеют крышечку и изогнутый шифтик. Экскреторный пузырь Y – образный. Развитие мирацидиев происходит после попадания яиц в воду. Оно завершается выходом мирацидиев из яиц на 9 сутки. Мирацидии имеют пигментный глазок. (Таблица 7).

### **Молекулярные характеристики**

Были получены молекулярные данные по участкам гена 28S рРНК и фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК для *S. spasskii*, длиной 1147 и 1511 п.н. соответственно. Из них для гена 28S рДНК 1041 (99.4%) оказались консервативными и 5 (0.5%) – парсимоний-информативными, а для участка ITS1–5.8S–ITS2 было обнаружено 1494 консервативных и 14 вариабельных сайта. Выявлено три варианта нуклеотидных последовательностей рДНК *S. spasskii*,

Нуклеотидные последовательности для *S. spasskii* доступны в Международном геномном банке под номерами: LN614538, HE806371, HE806376 LK022754–LK022757, LK022754, HG530210, HG530211 LK022759–LK022762, LK022758, LK022763, HE806363–HE806376, LN614538–LN614539, HG530210–HG530219, LN614540–LN614541, HG530224–HG530230, HG530203–HG530209, HG530228–HG530230, HG530207–HG530209

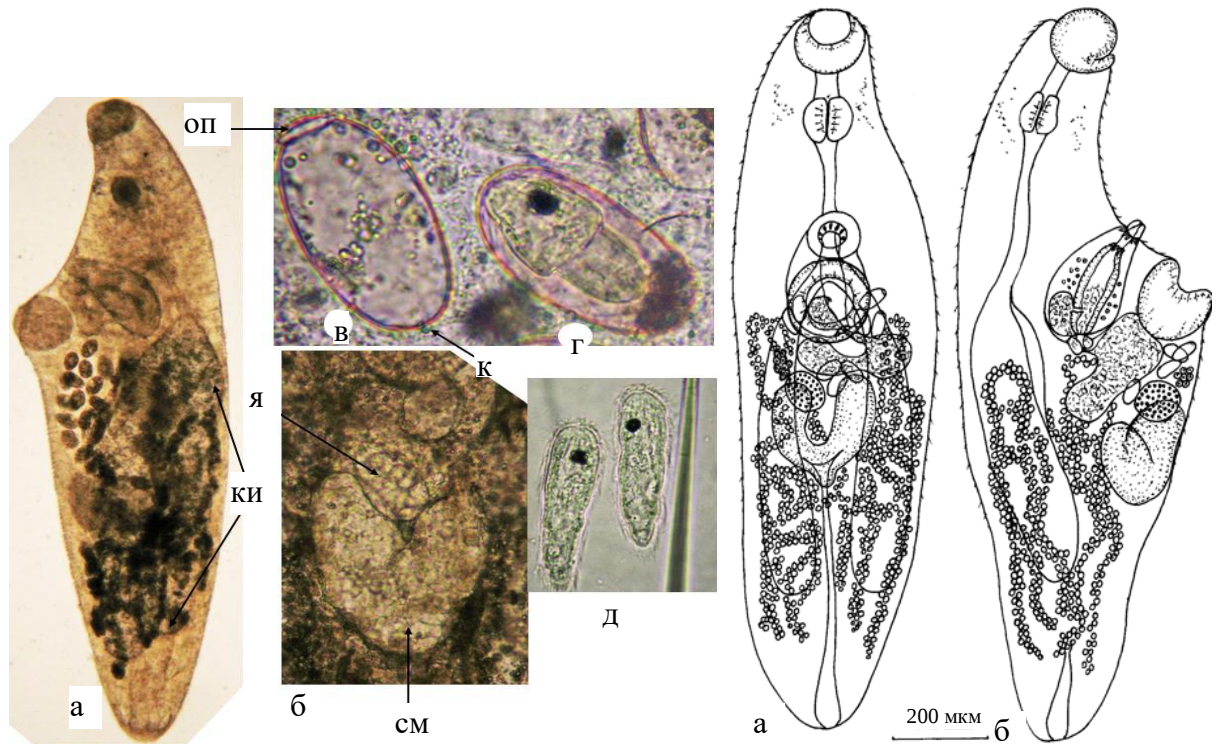


Рисунок 6. Половозрелые черви *Skrjabinoecithum spasskii*

а – вентрально; б – латерально; Фото: а – латерально; б – яичник и семенник, в – яйцо без мирацидия, г – яйцо на 9 день развития, д – мирацидии, ки – ветви кишечника; см – семенник; я – яичник, оп – крышечка.

**Примечание.** В 1954 г. Белоус были обнаружены трематоды сем. Harpororidae в кишечнике пиленгасов из реки Раздольной (= р. Суйфун). На основании изучения морфологии обнаруженных трематод ею был обоснован новый род *Skrjabinoecithum* с единственным видом *S. spasskii*. Нами трематоды этого вида также были обнаружены у пиленгасов из реки Раздольной, а также из рек Киевка и Карасик. Размеры червей в работе Белоус, вероятнее всего, даны по одному экземпляру *S. spasskii* (Таблица 9). Исследование большого числа

обнаруженных нами половозрелых червей показало, что они имеют ряд морфологических различий с червями, описанными Белоус. В описании вида сделанном Белоус у особей *S. spasskii* глазные пятна не отмечаются, кишечные ветви достигают середины длины тела и семенник шарообразный. Кроме того, в родовом диагнозе указывается, что у червей яйца без крышечки и мирацидий без пигментных глазков (Overstreet, Curran 2005). Однако эти данные ошибочны. Проведенные нами исследования показали, что половозрелые особи имеют диффузные пигментные пятна на переднем конце тела, на препаратах кишечные ветви червей большей частью скрыты желточными фолликулами. По этой причине установить границы ветвей кишечника затруднительно. Однако протяженность кишечника, немного не достигающего заднего конца тела, хорошо просматривается у живых особей (Рисунок 6) или на препаратах молодых червей имеющих небольшую плотность желточных фолликул. Наряду с этим нами установлено, что при положении червя на препарате латерально, или если срединная ось длины тела смещена влево или вправо семенник выглядит цельнокрайным, но при идеальном дорзо-вентральном положении червя семенник имеет V-образную форму (Рисунок 6). Кроме того в противовес особенностям строения яиц, развития и морфологии мирацидия представленных в родовом диагнозе по Оверстрит, Карран (Overstreet, Curran, 2005) - яйца в матке червей эмбрионально не развиты и развитие мирацидия происходит после попадания яиц в воду. Мирацидий имеет пигментный глазок и по окончании его формирования крышечка яйца открывается и мирацидий выходит в воду (Рисунок 6).

Оверстрит и Карран (Overstreet, Curran, 2005) отнесли к роду *Skrjabinolecithum* несколько видов трематод, описанных ранее в составе других родов: *Pseudohapladena bengalensis* Madhavi, 1979 (= *Skrjabinolecithum bengalense* (Madhavi, 1980) Overstreet, Curran, 2005), *Paraunisaccoides lobolecthus* Martin, 1973 (= *Skrjabinolecithum vitellosum* (Martin, 1973) Overstreet, Curran, 2005), *Unisaccoides vitellus* Martin, 1973 (= *S. vitellosum*) и *Malabarotrema indicum* Zhukov, 1972 (= *Skrjabinolecithum indicum* (Zhukov, 1972) Overstreet, Curran, 2005). Соответственно, роды *Paraunisaccoides*, *Unisaccoides* и *Malabarotrema* были

признаны младшими синонимами *Skrjabinolecithum*. По нашему мнению эти таксономические решения были сделаны на весьма зыбких основаниях. Как отмечают сами авторы этой, на момент публикации очень мало было известно о типовом виде рода *Skrjabinolecithum* – *S. spasskii* и поэтому трематоды этого вида ими не изучались. Тем не менее, Оверстрит и Карран (2005) включили в состав рода *Skrjabinolecithum* обозначенные выше виды трематод на основании некоторых общих морфологических особенностей, а именно: относительно «средняя» длина тела и мешковидный кишечник, одиночный или раздвоенный, заканчивается на уровне яичника, а также обнаружение этих видов в кефалевых рыбах Индо-Западной Пацифики (Overstreet, Curran, 2005). В нашей работе приведен обновленный подробный диагноз для типового вида рода *Skrjabinolecithum* – *S. spasskii*, представляющий собой основу родового диагноза, в соответствии с которым, по нашему мнению, необходимо включать те или иные виды гаплопорид в состав данного рода. Например, *S. vitellosum* и *S. lobolectithum* не соответствуют ключевым признакам типового вида (раздвоенный кишечник, V-образный семенник) и, вероятно, должны быть возвращены в роды *Unisaccoides* и *Paraunisaccoides* соответственно. Вид *S. indicum*, хотя и имеет раздвоенный кишечник, отличается формой тела, строением желточников и наличием подушечек гермафродитного канала — признаками, характерными для рода *Malabarotrema*. Этот род был выделен Жуковым (1972), позже синонимизирован с *Skrjabinolecithum* (Overstreet, Curran, 2005), но некоторыми авторами (Pulis, 2014) рассматривается как валидный. Таким образом, принимая во внимание новый диагноз рода *Skrjabinolecithum*, причисление трематод, известных на сегодняшний день как *S. indicum*, *S. vitellosum* и *S. lobolectithum*, к данному роду на основании морфологии выглядит сомнительным. Однако окончательные выводы по этому поводу можно будет сделать только при наличии молекулярных данных, о чем пойдет речь ниже.

Таблица 9. Размеры (мкм) *Skrjabinolecithum spasskii* по нашим данным и данным Белоус (1954)

n – число особей

| Характеристика                                         | Наши данные                     |                                        |                                           |                                 |                                     | Белоус (1954);    |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
|                                                        | Приморский край, Россия, неотип | Приморский край, Россия, диапазон n=13 | Приморский край, Россия, средние значения | о. Кат Ба, Вьетнам диапазон n=6 | о. Кат Ба, Вьетнам средние значения | Приморский регион |
| Длина тела                                             | 1510                            | 939–1510                               | 1086                                      | 800-1120                        | 980                                 | 1300              |
| Ширина тела                                            | 430                             | 292-430                                | 316                                       | 293-354                         | 334                                 | 440               |
| Длина ротовой присоски                                 | 131                             | 65-131                                 | 85                                        | 96-116                          | 106                                 | 135               |
| Ширина ротовой присоски                                | 146                             | 80-146                                 | 100                                       | 104-116                         | 111                                 | 140               |
| Расстояние от переднего конца тела до брюшной присоски | 447                             | 270-447                                | 334                                       | 270-381                         | 313                                 | -                 |
| Длина брюшной присоски                                 | 177                             | 104-177                                | 117                                       | 104-123                         | 114                                 | 165               |
| Ширина брюшной присоски                                | 177                             | 108-177                                | 118                                       | 104-123                         | 115                                 | 165               |
| Соотношение длины присосок                             | 1: 1.35                         | 1:1.13-1.64                            | 1:1.38                                    | 1:1.04-1.24                     | 1:1.08                              | 1:1.22*           |
| Отношение ширины присосок                              | 1: 1.21                         | 1:1.03-1.33                            | 1:1.18                                    | 1:1.03-1:1.24                   | 1:1:04                              | 1:1.22*           |
| Длина префаринкса                                      | 46                              | 35-58                                  | 46                                        | 19-39                           | 21                                  | -                 |
| Длина фаринкса                                         | 96                              | 39-96                                  | 58                                        | 54-65                           | 59                                  | 80                |
| Ширина фаринкса                                        | 96                              | 42-96                                  | 65                                        | 62-89                           | 77                                  | 80                |
| Длина пищевода                                         | 244                             | 50-244                                 | 84                                        | 139-223                         | 193                                 | -                 |
| Длина ветвей кишки                                     | 678                             | 539-801                                | 795                                       | 370-554                         | 416                                 | -                 |
| Длина яичника                                          | 73                              | 54-100                                 | 78                                        | 50-81                           | 67                                  | 100               |
| Ширина яичника                                         | 85                              | 54-85                                  | 59                                        | 46-65                           | 57                                  | 100               |
| Длина семенника                                        | 231                             | 112-231                                | 165                                       | 100-135                         | 116                                 | 140               |
| Ширина семенника                                       | 223                             | 92-239                                 | 164                                       | 104-212                         | 132                                 | 140               |
| Длина гермафродитной сумки                             | 262                             | 154-285                                | 210                                       | 135-177                         | 161                                 | 250               |
| Ширина гермафродитной сумки                            | 177                             | 100-177                                | 125                                       | 96-135                          | 116                                 | 110               |
| Расстояние от заднего конца тела до семенника          | 500                             | 270-500                                | 353                                       | 258-420                         | 331                                 | -                 |
| Длина яиц                                              | 61-65                           | 50-65                                  | -                                         | 54-62                           | -                                   | 62                |
| Ширина яиц                                             | 31                              | 31-42                                  | -                                         | 31-39                           | -                                   | 43                |

\* наши дополнения, исходя из размеров присосок по данным Белоус (1954)

***Skrjabinolecithum pyriforme* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko, Beloded,  
2017**

*Типовой хозяин:* *Mugil cephalus* (лобан).

*Другой хозяин:* *Planiliza haematocheilus* (пиленгас)

*Типовое местообитание:* река Киевка, 42°52'N, 133°39'E

*Иные места обнаружения:* бассейн реки Раздольная, 43°20'N, 131°47'E;

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* пиленгас 2-27 трематод, лобан 3-6 трематод.

*Исследованный материал:* 4 экземпляра

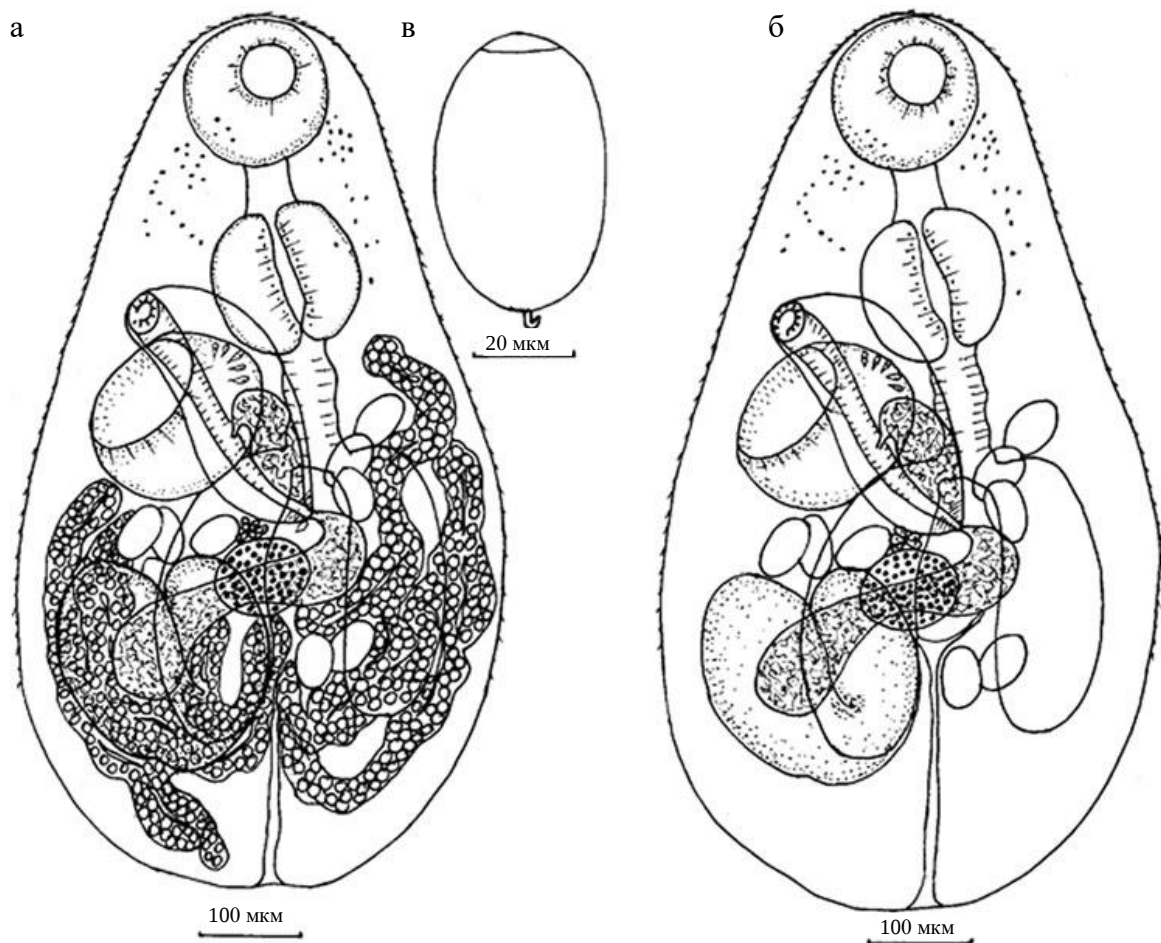


Рисунок 7. *Skrjabinolecithum pyriforme*: а - вентрально, б - вентрально без желточников, в - яйцо.

*Описание взрослого червя* (Рисунок 7, Таблица 10). Тело овальное или пирамидальное, от переднего конца до задней трети покрыто шипиками. Глазные пятна диффузные, расположены в передней трети тела. Ротовая присоска

субтерминальная, префаринкс короткий, фаринкс округлый равен по размерам ротовой присоске, пищевод длиннее префаринкса, кишечные ветви широкие, достигают уровня заднего края семенника. Брюшная присоска равна или немного больше ротовой присоски. Семенник один V – образный, находится сзади брюшной присоски. Гермафродитная сумка мешковидная. Она находится дорзально от брюшной присоски, которая частично ее прикрывает. Задний край гермафродитной сумки расположен на уровне заднего края брюшной присоски. Половое отверстие располагается справа от средней линии перед брюшной присоской на уровне фаринкса. Половое отверстие и задний конец сумки снабжены мышечными сфинктерами. В гермафродитной сумке имеются внутренний семенной пузырек и немногочисленные простатические клетки. Наружный семенной пузырек хорошо развит и достигает уровня семенника. Яичник округлый, или неправильной формы прилегает к переднему краю семенника. Тельце Меллиса, состоит из крупных клеток. Желточники лентовидные, состоят из мелких, круглых плотно прилегающих друг к другу фолликул. Желточные поля располагаются от уровня брюшной присоски до конца тела. Левое и правое поля желточников сливаются на медианной линии и прикрывают яичник, семенник и кишечные ветви. Матка короткая, ограничена в переднезаднем направлении гермафродитной сумкой и передней границей семенника. В матке от 7 до 22 яиц. Яйца светло-желтые с крышечкой и изогнутым шифтиком, не содержат микровидия (Рисунок 7). Экскреторный пузырь Y – образный.

### **Молекулярные характеристики**

Были получены молекулярные данные по участкам гена 28S рРНК и фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК для *S. pyriforme*, длиной 1243 и 1294 п.н. соответственно. Для участка ITS1–5.8S–ITS2 было обнаружено три переменных сайта, фрагмент 28S рДНК оказался консервативным. Нуклеотидные последовательности для *S. pyriforme*, доступны в Международном генном банке под номерами: HE806359–HE806362, LN864990–LN864993.

Таблица 10. Морфометрическое сравнение (в мкм) *Skrjabinolecithum pyriforme* с близкородственными видами

| Характеристики                      | <i>Skrjabinolecithum pyriforme</i> |          |                     | <i>S. spasskii</i> | <i>S. spinosum</i> | <i>S. indicum</i><br>по Overstreet,<br>Curran, 2005 | <i>Platydidymus</i><br><i>flecterotestis</i><br>по Overstreet,<br>Curran, 2005 | <i>Carassotrema</i><br><i>flecterotestis</i><br>по Yu, et al.<br>2005 |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                                     | Голотип                            | Диапазон | Среднее<br>значение |                    |                    |                                                     |                                                                                |                                                                       |
| Длина тела                          | 878                                | 878–1090 | 979                 | 939–1510           | 801–294            | 1000–1200                                           | 950–2100                                                                       | 490–700                                                               |
| Ширина тела                         | 493                                | 493–575  | 579                 | 292–430            | 323–462            | 0.520–390                                           | 170–270                                                                        | 150–360                                                               |
| Длина ротовой присоски              | 142                                | 142–158  | 149                 | 83–140             | 100–139            | 120–230                                             | 60–130                                                                         | 100–150                                                               |
| Ширина ротовой присоски             | 142                                | 142–166  | 156                 | 80–146             | 119–146            | 100–140                                             | 120–280                                                                        | 150–300                                                               |
| Передняя часть                      | 362                                | 297–363  | 308                 | 210–310            | 293–408            | 200–400                                             | 170–250                                                                        | 150–360                                                               |
| Длина брюшной присоски              | 183                                | 166–185  | 175                 | 210–300            | 104–135            | 180–350                                             | 220–340                                                                        | 300–470                                                               |
| Префаринкс                          | 156                                | 135–145  | 140                 | 30–45              | 19–131             | 200–280                                             | 120–160                                                                        | 110–150                                                               |
| Глотка, длина                       | 154                                | 154–170  | 162                 | 39–96              | 77–100             | 110–280                                             | 130–180                                                                        | 150–300                                                               |
| Глотка, ширина                      | 168                                | 165–186  | 179                 | 60–70              | 85–135             | 120–200                                             | 150–200                                                                        | 250–350                                                               |
| Пищевод                             | 92                                 | 91–120   | 114                 | 62–83              | 123–158            | 150–200                                             | 180–0.280                                                                      | 200–320                                                               |
| Кишка                               | 335                                | 227–343  | 290                 | 317–400            | -                  | 370–490                                             | 390–450                                                                        | 500–700                                                               |
| Яичник, длина                       | 238                                | 96–96    | 108                 | 62–83              | 69–116             | 60–100                                              | 140–180                                                                        | 190–350                                                               |
| Яичник, ширина                      | 96                                 | 96–123   | 121                 | 62–83              | 81–123             | 60–90                                               | 90–120                                                                         | 120–200                                                               |
| Семенник, длина                     | 96                                 | 96–105   | 101                 | 80–90              | 173–262            | 170–210                                             | 200–280                                                                        | 310–500                                                               |
| Семенник, ширина                    | 93                                 | 93–123   | 107                 | 62–83              | 119–254            | 60–80                                               | 60–100                                                                         | 80–150                                                                |
| Гермафродитная сумка, длина         | 100                                | 120–132  | 126                 | 90–112             | 162–262            | 90–150                                              | 120–180                                                                        | 140–230                                                               |
| Гермафродитная сумка, ширина        | 127                                | 116–142  | 129                 | 110–140            | 81–135             | 80–140                                              | 140–240                                                                        | 150–250                                                               |
| Длина от заднего конца до семенника | 119                                | 116–125  | 122                 | 100–130            | 154–366            | 150–200                                             | 200–300                                                                        | 250–350                                                               |
| Яйца, длина                         | 54–58                              | 54–60    | –                   | 71–79              | 58–65              | 39–43                                               | 73–95                                                                          | 72–88                                                                 |
| Яйца, ширина                        | 33–35                              | 33–38    | –                   | 39–48              | 35–39              | –                                                   | –                                                                              | –                                                                     |

**Примечание.** Образцы *Skrjabinolecithum pyriforme* по топологии органов и ряду других морфологических признаков: нитевидному желточнику, V-образному семеннику, эмбрионально неразвитым яйцам соответствуют диагнозу рода *Skrjabinolecithum*. При этом *S. pyriforme* отличается от типового вида размером и формой тела, а также размерами ротовой присоски, глотки и яиц и соотношением длины и ширины тела (Таблица 10). В отличие от *S. bengalensis* (Madhavi, 1980) черви из нашего материала имеют V-образный семенник и нитевидные фолликулы желточника, а два других вида *S. vitellosum* и *S. loboecithum* отличаются от *S. pyriforme* наличием одной слепой кишки. Образцы *S. pyriforme* были сходны по большинству морфологических и метрических признаков с *Platydidymus flecterotestis*, который впервые был описан Жуковым (1971) от *Leiocassis brashnikowi* Berg, 1907 и *P. haematocheilus* из реки Ляо. Оверстрит и Карран (2005) отметили, что родовое название '*Hapalotrema*' является преокупированным, изучили ряд образцов червей, собранных Жуковым и включили их в новый род, *Platydidymus*, в качестве вида типа *P. flecterotestis* (Waretrematinae). Ю и соавт. (2005), на основании изучения морфологии червей, найденных в *Planiliza carinata* Valenciennes, 1836 из Тайваня, перевели *Hapalotrema flecterotestis* в *Carassotrema* как *C. flecterotestis* (Waretrematinae). Морфологически трематоды *Skrjabinolecithum pyriforme* наиболее близки к червям, представленным в публикации Жукова (1971). В обоих случаях эти черви имеют нитевидный желточник и V-образный семенник. Однако, образцы *S. pyriforme* отличаются от описанных Жуковым червей меньшими максимальными размерами длины тела и меньшими размерами семенников и яиц (Таблица 10). Образцы *S. pyriforme* отличаются от *P. flecterotestis*, как описано Ю с соавт. (2005), по тем же метрическим признакам. В описаниях *C. flecterotestis* и *P. flecterotestis*, в отличие от червей из нашего материала, желточник состоит из отдельных удлиненных фолликулов (Overstreet, Curran, 2005; Yiu et al., 2005). Кроме того, виды этих двух родов отличаются от *S. pyriforme* наличием мирацидия в яйцах, находящихся в матке (Overstreet, Curran, 2005). Поэтому трематоды, выявленные и описанные нами у кефалей из Приморского края, не

могут быть отнесены ни к одному из видов, описанных ранее Жуковым (1971), Ю (2005) или Оверстритом (2005) на основе морфологических признаков. Исходя из обозначенных морфологических различий между обнаруженными нами червями и другими представителями подсем. Waretrematinae, первые были признаны новым видом в составе *Skrjabinolecithum* (Overstreet, Curran, 2005; Yiu et al., 2005).

***Skrjabinolecithum spinosum* Besprozvannykh, Atopkin, Ngo, Ha, Tang,  
Beloded, 2017**

*Типовой хозяин: Mugil cephalus* (лобан).

*Типовое местообитание:* река Киевка, 42°52'N, 133°39'E

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* 10 трематод

*Исследованный материал:* 10 экземпляров

*Описание взрослого червя* (Рисунок 8, Таблица 10). Тело удлинненное, покрыто шипами. Пигментные глазки рассредоточены в передней трети тела. Ротовая присоска субтерминальная. Префаринкс короткий, глотка поперечно овальная. Пищевод длиннее префаринкса. Кишка широкая, выходит за края яичника. Размер брюшной присоски соответствует ротовой, располагается на границе между передней и средней третью тела. Семенник одиночный V-образный, располагается в конце средней трети тела. Семенной пузырек овальный или иной формы, в зависимости от наполненности. Гермафродитная сумка овальная или мешковидная, расположена позади брюшной присоски. Гермафродитный проток мускулистый с шестью спирально расположенными рядами подушечек, по 6–8 подушечек в каждом ряду. Каждая подушечка имеет два шипа на сетчатом склеротизированном основании. Половое отверстие находится на средней линии тела непосредственно перед брюшной присоской. Метратерм короткий и тонкостенный. Желточники простираются от среднего уровня брюшной присоски или средней части тела до заднего конца, имеет вид ленты и состоит из небольших круглых фолликулов, тесно прилегающих друг к другу. Оба желточных поля соединяются по средней линии тела и покрывают

яичник, семенник и кишку. Яичник округлой или поперечно овальной формы, прилегает к переднему краю семенника слева от средней линии тела. Матка короткая, находится между гермафродитной сумкой и передним краем семенника, содержит яйца без эмбрионов. Яйца бело-желтые, покрытые оболочкой. Экскреторный пузырь Y-образный (Рисунок 8).

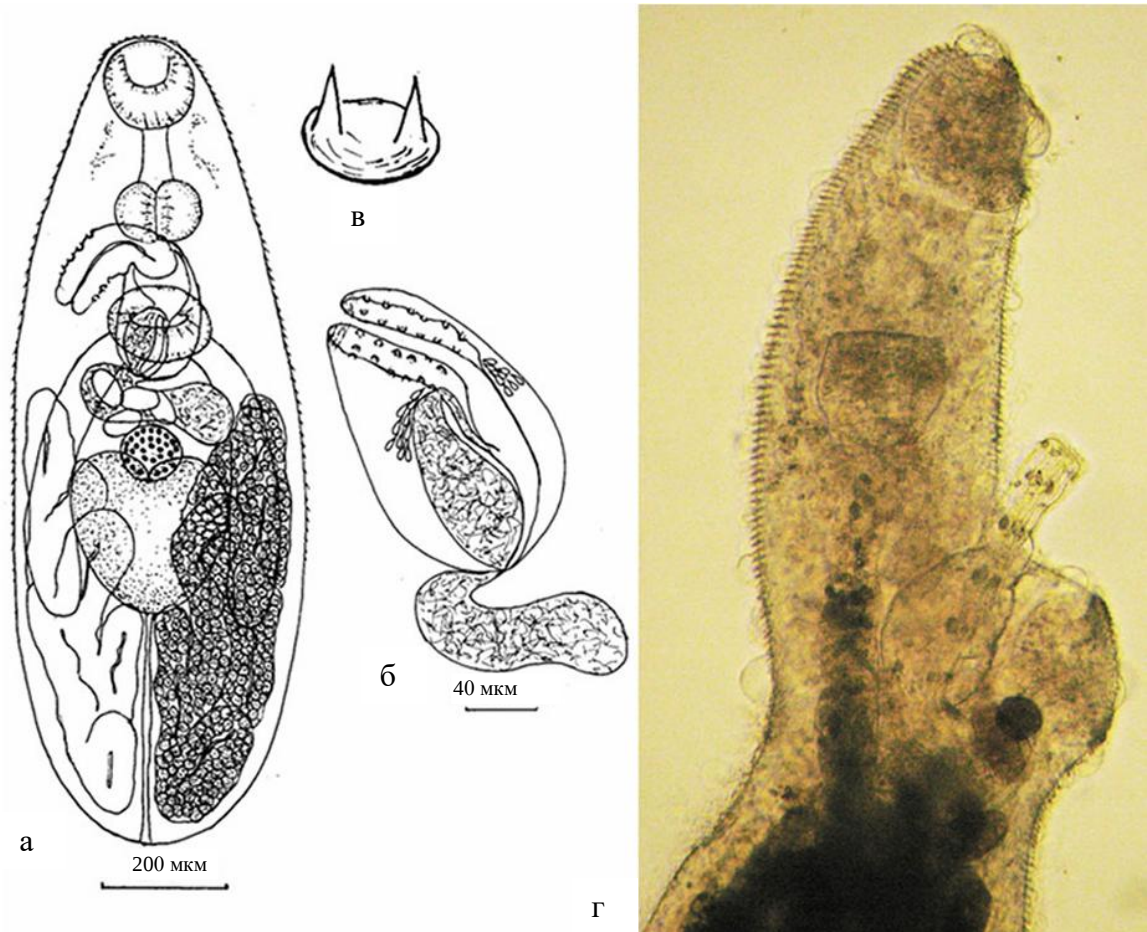


Рисунок 8. *Skrjabinolecithum spinosum* а – взрослый червь вентрально, б – гермафродитная сумка, в – шипы на ретикулярном склеротизованном основании, г – гермафродитный проток с подушечками

### Молекулярные характеристики

Были получены молекулярные данные по участкам гена 28S рРНК и фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК для *S. spinosum*, длиной 1311 и 1184 п.н. соответственно. Для участка ITS1–5.8S–ITS2 был обнаружен один вариабельный сайт, фрагмент 28S рДНК оказался консервативным. Нуклеотидные последовательности для *S.*

*spinosum* доступны в Международном генном банке под номерами: MF176829 - MF176834.

### **Таксономия и филогенетические связи видов *Skrjabinolecithum* по молекулярным данным**

Для подтверждения таксономических выводов, основанных на данных морфологии, были проведены молекулярные исследования, включающие анализ нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S-ITS2 (1294 п.н.) и фрагмента гена 28S рРНК (1243 п.н.). Дифференциация последовательностей, оцененная с помощью расчета р-дистанций (Таблица 11, 12) между *S. pyriforme* и *S. spassskii*, составила  $0.93 \pm 0.27\%$  и  $2.14 \pm 0.67\%$  по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК и ITS1–5.8S–ITS2 рДНК, соответственно. Генетические дистанции между *S. spinosum* и *S. spassskii* по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК составили 0.03% и  $0.4 \pm 0.02\%$  по ITS1–5.8S–ITS2 рДНК., а между *S. spinosum* и *S. pyriforme*  $0.94 \pm 0.3\%$  и  $3.3 \pm 0.6\%$  соответственно.

Филогенетический анализ показал, что род *Skrjabinolecithum* является монофилетической группой с высокой статистической поддержкой (Рисунок 9); *S. spinosum* кластеризуется с *S. pyriforme* по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК (Рисунок 9) и с *S. spassskii* по объединенным данным секвенирования последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 + 28S рДНК (Рисунок 10). Генетическая дифференциация варьировала от 0.03% для *S. spinosum* до  $0.94 \pm 0.3\%$  для *S. pyriforme* и *S. spassskii* по данным участка гена 28S рРНК и  $0.4 \pm 0.02\%$  и  $3.3 \pm 0.6\%$  для *S. spassskii* и *S. pyriforme* соответственно, по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 рДНК. Согласно полученным нами данным, эти значения соответствуют межвидовому уровню генетической дифференцировки, оцениваемому по фрагментам рибосомной ДНК, полученным ранее для других представителей семейства Harporidae (Blasco-Costa et al., 2009; Pulis et al., 2013). Например, генетическая дифференциация в пределах рода *Saccocoelium* варьировала от  $0.9 \pm 0.31\%$  до  $4.8 \pm 0.68\%$  по данным секвенирования по 28S рДНК и от  $1.55 \pm 0.57\%$  до  $8.33 \pm 1.39\%$  по данным секвенирования ITS1–5.8S–ITS2 рДНК (Blasco-Costa et

al., 2009). В пределах Waretrematinae генетическая дифференциация варьировала от  $11.1 \pm 0.94\%$  (*Parasaccocoelium mugili*) до  $13.7 \pm 1.05\%$  (*Capitimitta darwinensis*) по участку 28S рДНК, и от  $15.6 \pm 1.91\%$  (*Spiritestis herveyensis*) до  $16.63 \pm 1.66\%$  (*Unisaccus tonkini*) по данным секвенирования ITS1–5.8S–ITS2 рДНК. Такие же значения генетической дифференциации были получены при сравнительном анализе *S. spasskii* относительно других видов подсем. Waretrematinae (Таблица 11, 12).

Проведенный анализ филогенетических связей показал, что род *Skrjabinolecithum* принадлежит к подсемейству Waretrematinae, образуя кладу, тесно связанную с родом *Carassotrema*, и включает в себя три вида: *S. spasskii*, *S. spinosum* и *S. pyriforme* с высокой статистической поддержкой. При этом, виды родов *Spiritestis* и *Intromugil*, относящиеся к тому же подсемейству, значительно удалены друг от друга на филогенетическом дереве и кластеризуются с представителями подсемейства Harporinae. Дифференциация последовательностей 28S рДНК для *S. spasskii* от представителей родов *Intromugil* и *Capitimitta* относительно велика и составляет 11.6–12.9%. Аналогичная дифференциация наблюдается между *S. spasskii* и *Spiritestis herveyensis* и равна 12.1%, несмотря на то, что оба вида принадлежат одному и тому же подсемейству (Overstreet, Curran 2005; Pulis, Overstreet, 2013; Pulis et al., 2013). Эти оценки значительно превосходят уровень межродовой дифференциации внутри подсемейства Harporinae (Nicoll, 1914), который составляет 4.8–8% (Blasco-Costa et al., 2009). Подобный уровень дифференциации наблюдается также между родами *Saccocoelioides* и *Intromugil* и составляет 7.9%.

На основании этих данных, мы подтверждаем валидность рода *Skrjabinolecithum*, а также включенных в него трех видов *S. spasskii*, *S. spinosum* и *S. pyriforme*.

Таблица 11. Генетическая дифференциация (под диагональю %) и стандартная ошибка внутри семейства Harpororidae по данным секвенирования 28S участка

| Таксон                                | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12   |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1. <i>Skrjabinolecithum spasskii</i>  |       | 0.3   | 0.30  | 0.94  | 0.97  | 0.98  | 1.10  | 1.06  | 0.98  | 0.98  | 1.00  | 1.01 |
| 2. <i>Skrjabinolecithum pyriforme</i> | 0.99  |       | 0.10  | 0.94  | 0.96  | 0.97  | 1.10  | 1.06  | 0.98  | 0.98  | 0.99  | 1.04 |
| 3. <i>Skrjabinolecithum spinosum</i>  | 1.08  | 0.10  |       | 0.96  | 0.97  | 0.98  | 1.10  | 1.06  | 0.98  | 0.98  | 0.99  | 1.04 |
| 4. <i>Parasaccocoelium mugili</i>     | 11.40 | 11.10 | 11.20 |       | 0.30  | 0.58  | 1.00  | 0.99  | 0.96  | 0.89  | 0.88  | 0.95 |
| 5. <i>P.haematocheilum</i>            | 11.49 | 11.28 | 11.38 | 0.92  |       | 0.61  | 1.05  | 1.03  | 0.99  | 0.91  | 0.93  | 0.99 |
| 6. <i>P.polyovum</i>                  | 12.04 | 11.83 | 11.93 | 3.38  | 3.79  |       | 1.03  | 0.99  | 0.98  | 0.92  | 0.90  | 0.92 |
| 7. <i>Unisaccus tonkini</i>           | 14.41 | 13.91 | 14.01 | 12.53 | 13.17 | 13.22 |       | 0.52  | 0.76  | 0.99  | 1.00  | 1.02 |
| 8. <i>Unisaccus halongi</i>           | 13.77 | 13.57 | 13.47 | 11.69 | 12.51 | 12.66 | 2.79  |       | 0.70  | 1.00  | 0.99  | 0.98 |
| 9. <i>Paraunisaccoides elegans</i>    | 12.44 | 11.94 | 12.04 | 11.47 | 12.07 | 11.59 | 7.09  | 6.57  |       | 0.98  | 0.99  | 1.03 |
| 10. <i>Capitimitta darwinensis</i>    | 13.21 | 13.41 | 13.41 | 11.25 | 11.34 | 12.41 | 13.86 | 13.33 | 12.99 |       | 0.57  | 1.00 |
| 11. <i>Capitimitta costata</i>        | 12.81 | 12.81 | 12.81 | 11.55 | 12.27 | 12.51 | 13.35 | 13.23 | 12.89 | 3.56  |       | 1.01 |
| 12. <i>Spiritestis herveyensis</i>    | 12.14 | 11.94 | 12.04 | 11.25 | 11.85 | 11.78 | 12.29 | 12.15 | 12.62 | 13.29 | 13.10 |      |

Таблица 12. Генетическая дифференциация (под диагональю %) и стандартная ошибка внутри семейства Harpororidae по данным секвенирования ITS1–5.8S–ITS2 участка

| Таксон                                | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10   |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1. <i>Skrjabinolecithum spasskii</i>  |       | 0.61  | 0.56  | 1.47  | 1.68  | 1.63  | 1.54  | 1.57  | 1.66  | 1.56 |
| 2. <i>Skrjabinolecithum pyriforme</i> | 1.80  |       | 0.79  | 1.45  | 1.71  | 1.66  | 1.55  | 1.59  | 1.69  | 1.57 |
| 3. <i>Skrjabinolecithum spinosum</i>  | 1.57  | 3.15  |       | 1.57  | 1.74  | 1.68  | 1.61  | 1.57  | 1.67  | 1.60 |
| 4. <i>Parasaccocoelium mugili</i>     | 11.74 | 11.51 | 12.87 |       | 1.59  | 1.50  | 1.37  | 1.37  | 1.45  | 1.56 |
| 5. <i>Unisaccus tonkini</i>           | 15.51 | 15.96 | 16.63 | 13.51 |       | 0.90  | 1.47  | 1.73  | 1.69  | 1.68 |
| 6. <i>Unisaccus halongi</i>           | 15.28 | 15.73 | 16.40 | 11.94 | 3.58  |       | 1.43  | 1.62  | 1.54  | 1.69 |
| 7. <i>Paraunisaccoides elegans</i>    | 12.36 | 12.58 | 13.48 | 9.46  | 10.54 | 10.31 |       | 1.61  | 1.69  | 1.64 |
| 8. <i>Capitimitta darwinensis</i>     | 14.09 | 14.55 | 14.55 | 10.02 | 15.87 | 14.51 | 13.61 |       | 0.98  | 1.53 |
| 9. <i>Capitimitta costata</i>         | 15.65 | 15.65 | 16.33 | 10.91 | 16.06 | 14.03 | 14.71 | 4.77  |       | 1.58 |
| 10. <i>Spiritestis herveyensis</i>    | 13.12 | 13.35 | 14.03 | 12.47 | 15.99 | 15.54 | 14.45 | 11.64 | 12.53 |      |

Топология филогенетического дерева, построенного по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК (Рисунок 9) продемонстрировала близкие связи *S. pyriforme* и *S. spinosum*, в то время как *S. spasskii* оказался сестринским по отношению к этим двум видам. Эти виды образовали общую высоко поддержанную кладу, тесно связанную с трематодами *Carassotrema koreanum*, паразитами карасей.

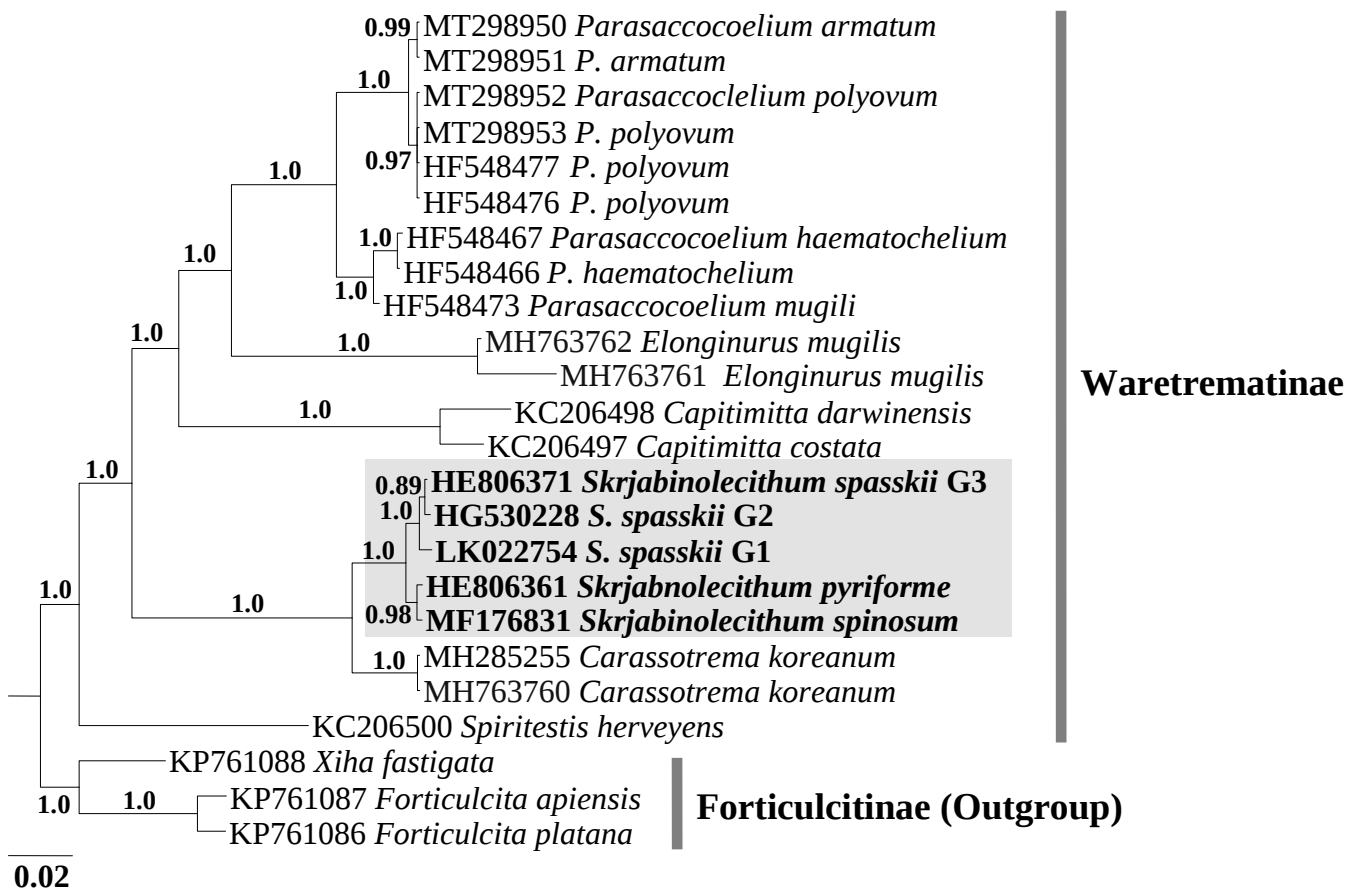


Рисунок 9. Фрагмент филогенетического дерева семейства Harpororidae, реконструированного на основе частичных последовательностей 28S рДНК с использованием Байесовского алгоритма. Узловые числа указывают на апостериорные вероятности; показаны только значимые оценки (0.9–1.0). Описанные и обоснованные виды *Skrjabinolecithum* выделены жирным шрифтом.

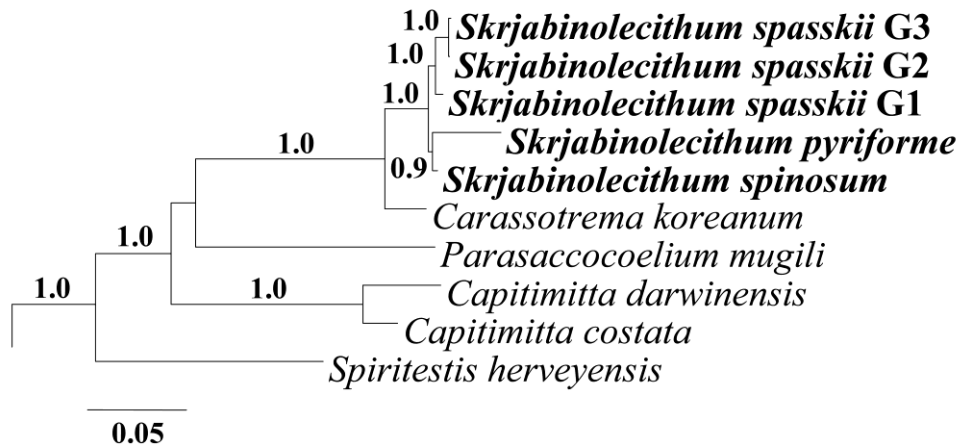


Рисунок 10. Фрагмент филогенетического древа семейства Haploporidae, реконструированного на основе объединенных нуклеотидных последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 рДНК и частичных последовательностей 28S рДНК с использованием Байесовского алгоритма. Узловые числа указывают на апостериорные вероятности. Описанные и обоснованные виды *Skrjabinolecithum* выделены жирным шрифтом.

#### Внутривидовая генетическая изменчивость *Skrjabinolecithum spasskii*

Топологии филогенетических деревьев, реконструированных на основе данных секвенирования участка гена 28S рРНК и фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК *S. spasskii*, указывали на внутривидовую дифференциацию этого вида (Рисунок 11, 12).

По данным секвенирования фрагментов рибосомной ДНК трематоды *S. spasskii* из пиленгасов юга Дальнего Востока России и Вьетнама дифференцировались на три группы, каждая из которых характеризовалась наличием одного общего, наиболее представленного варианта последовательности. Эти варианты в разных группах отличались друг от друга фиксированными нуклеотидными заменами. Вариант I был характерным для трематод, извлеченных из *P. haematocheilus* в различных водотоках Приморского края (р. Киевка, р. Раздольная, р. Карасик) и от одной особи *M. cephalus* из р. Раздольная. Вариант II наблюдался у трематод, которые были получены от *M. cephalus*, выловленном в заливе Тонкин, недалеко от острова Кат Ба (Вьетнам).

Вариант III был обнаружен у пяти трематод, которые были выделены из *P. haematocheilus* реки Киевка (Приморье).

Значение генетических дистанций между приморскими вариантами I и III составили 0.4 и 0.65% по данным секвенирования гена 28S рРНК и фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, соответственно. Самые низкие значения генетических дистанций, 0.1 и 0.33% по данным секвенирования 28S и ITS1–5.8S–ITS2 рДНК, соответственно, наблюдались между вариантами II (Вьетнам) и III (Приморье). Нуклеотидные последовательности 28S рДНК наиболее дифференцированных вариантов I и II (0.5 и 0.9 % по данным секвенирования 28S и ITS) содержали 5 сайтов с фиксированными точечными заменами, включая четыре транзиции (Т / С) и одна трансверсия (Т / А). Варианты I и II нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК отличались по 12 сайтам с фиксированными заменами, включая девять транзиций (шесть Т / С и три А / Г) и три трансверсии в терминальной области фрагмента ITS1 (Таблица 13, 14).

Реконструкция дерева минимальных связей MST, созданная на основе объединенных данных секвенирования рДНК показала, что редкий для Приморья вариант III тесно связан с вьетнамским вариантом II, будучи отделенным пятью мутационными шагами (Рисунок 11). С другой стороны, вариант III из Приморья отделяется от основного варианта I Приморья на 14 мутационных шагов. Таким образом трематоды от кефалей Приморского края, обладающие разными вариантами последовательностей 28S рДНК, дифференцированы друг от друга в большей степени, чем приморский вариант III от вьетнамского (вариант II). Тем не менее, оба приморских варианта связаны друг с другом напрямую, в то время как вьетнамский вариант имеет прямую связь с приморским вариантом III. Гипотетически это означает, что вариант III последовательностей 28S рДНК представляет собой предковую последовательность по отношению к вариантам I и II из Приморья и Вьетнама, соответственно.

Таблица 13. Фиксированные нуклеотидные замены разных вариантов фрагмента 28S рДНК в генотипах *Skrjabinolectithum spasskii* и результаты теста идентификации анцестральной последовательности

| Сайт                                                   | 530 | 543 | 564 | 569 | 662 |
|--------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Вариант I                                              | C   | C   | T   | C   | T   |
| Вариант III                                            | C   | T   | C   | T   | A   |
| Вариант II                                             | T   | T   | C   | T   | A   |
| Анцестральный анализ идентификации последовательностей |     |     |     |     |     |
| Замены,<br>p > 90%                                     | C→T | C→T | C→C | C→T | T→A |

Таблица 14. Фиксированные нуклеотидные замены разных вариантов фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК *Skrjabinolectithum spasskii* и результаты теста идентификации анцестральной последовательности.

|                                                        | 140 | 145 | 199 | 242 | 301 | 347 | 348 | 355 | 357 | 1206 | 1255 | 1256 |
|--------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| Вариант I                                              | C   | G   | T   | C   | T   | C   | C   | T   | A   | T    | T    | C    |
| Вариант III                                            | C   | G   | T   | T   | T   | A   | T   | A   | G   | C    | C    | T    |
| Вариант II                                             | T   | A   | C   | T   | G   | A   | T   | A   | G   | C    | C    | T    |
| Анцестральный анализ идентификации последовательностей |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
| Замены,<br>P > 90%                                     | C→T | G→A | T→C | C→T | T→G | C→A | C→T | T→A | A→G | T→C  | T→C  | C→T  |

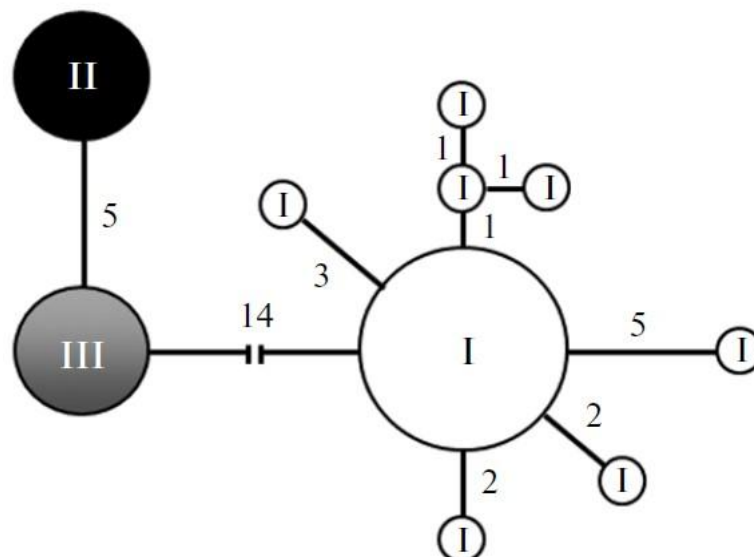


Рисунок 11 Реконструкция гаплотипической сети с использованием комбинированных последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 и 28S рДНК *Skrjabinolecithum spasskii*, с помощью алгоритма максимального правдоподобия. Цифры между узлами – количество мутационных шагов.

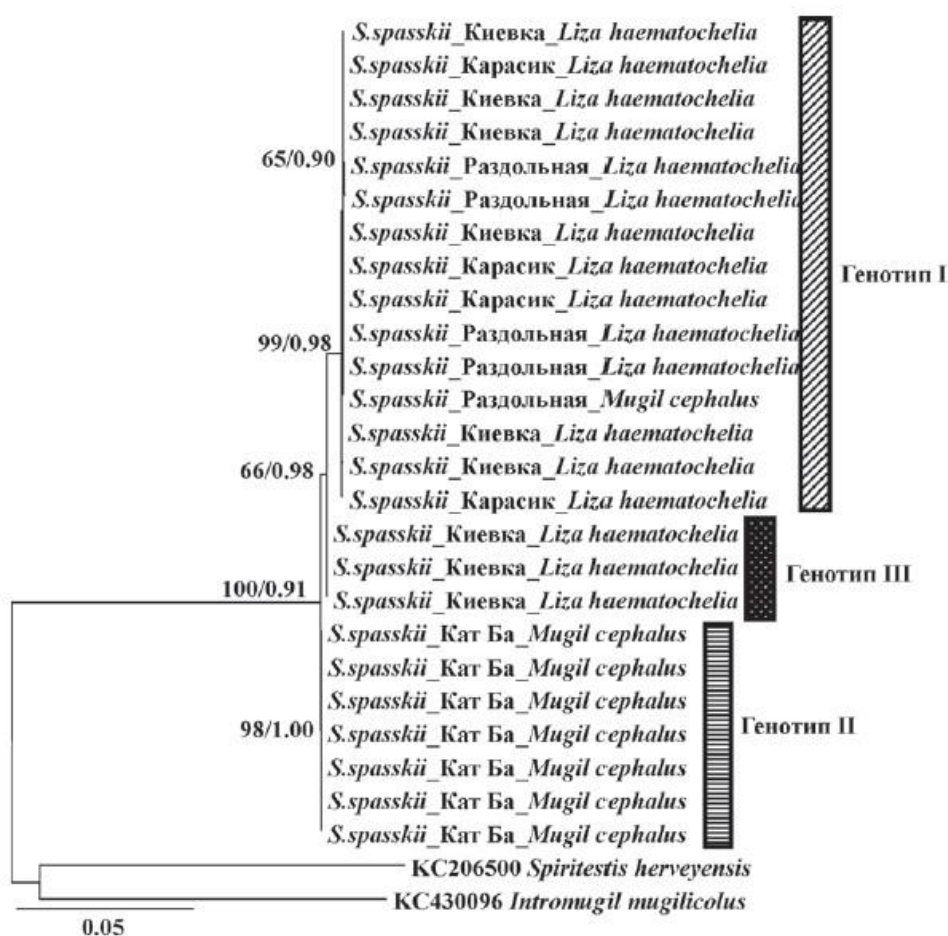


Рисунок 12 Филогенетическое дерево *Skrjabinolecithum spasskii*, реконструированное на основе анализа объединенных данных секвенирования участка гена 28S рРНК и фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК.

### 3.3. Морфологическая и генетическая характеристика трематод родов

#### *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* от кефалевых рыб Вьетнама

В 1973 году Мартин внутри семейства гаплопорид обосновал новое подсемейство Unisaccinae, включающее в себя новый род *Unisaccus* и новые виды *U. brisbanensis* и *U. spinosus*, а так же новый род *Unisacoides* включающий в себя вид *U. vitellus*, обнаруженные в кишечнике кефалевых рыб из реки Брисбен, Квинсленд, Австралия (Martin, 1973). Автор описывает представителей этого подсемейства как мелких червей, с тегументальными шипами. У взрослых особей имеется остаточная пигментация от глазков. Ротовая присоска субтерминальная, брюшная присоска располагается в передней половине тела. Кишка одиночная, гермафродитный проток может быть вооружён. Семенник, расположен в заднем конце тела, желточник фолликулярный, яичник располагается перед семенником. Экскреторный пузырь Y-образный. Типовой вид *U. brisbanensis*. Также Мартин (Martin, 1973) обосновал род *Paraunisaccoides*, включивший в себя типовой вид *Paraunisaccoides lobolectithus*. Черви, относящиеся к данному виду, имеют по описанию удлиненное тело, очень длинный префаринкс, относительно длинную глотку, матку, расположенную между семенником и гермафродитной сумкой, желточники занимают положение между средней и задней частями тела. На основании сходства морфологических признаков Оверстрит и Карран свели данный род в синонимы *Skrjabinolecithum* (Overstreet, Curran, 2005).

При изучении трематод из мугилид Вьетнама нами были обнаружены половозрелые черви, как соответствующие морфологическим критериям рода *Unisaccus*, так и особи, имеющие отличные морфологические признаки, но по молекулярным показателям входящие в состав этого рода. В связи с этим мы дополняем родовой диагноз для представителей *Unisaccus* новыми морфологическими характеристиками. Кроме того основываясь на морфо-молекулярных данных мы восстанавливаем род *Paraunisaccoides*, который был сведен в синонимы *Skrjabinolecithum* (Overstreet, Curran, 2005).

**Род:** *Unisaccus* Martin, 1973

**Типовой вид:** *Unisaccus brisbanensis* Martin, 1973

**Диагноз рода** (с учетом новых молекулярных данных)

Тело мешковидное или удлиненное колбовидное, кутикула с шипами. Пигментные глазки рассредоточены в передней части тела. Ротовая присоска субтерминальная. Префаринкс длинный, достигает полового отверстия или брюшной присоски. Глотка на уровне брюшной присоски, шаровидная, или овальная. Пищевод короткий. Кишка одиночная, мешковидная, достигает средней или задней трети тела. Брюшная присоска крупнее ротовой, располагается презкваториально. Семенник одиночный, в задней половине тела. Гермафродитная сумка овальной формы, большей частью на уровне вентральной присоски. Передний конец гермафродитной сумки с мышечным сфинктером. Гермафродитный проток вооружен. Наружный семенной пузырь мешковидный. Внутренний семенной пузырь овальной формы. Половое отверстие открывается по средней линии тела перед брюшной присоской. Яичник сферический, прилегает к переднему краю семенника. Матка короткая, между передним краем семенника и гермафродитной сумкой. Желточник состоит из круглых, овальных или крупных удлиненных фолликулов, расположенных латерально сзади от брюшной присоски. Яйца многочисленные, с крышечками. Экскреторный пузырь Y или I-образный.

***Unisaccus tonkini* Atopkin, Besprozvannykh, Beloded, Ha, Nguyen, Nguyen, 2017**

*Типовой хозяин:* *Moolgarda cunnesius*

*Другой хозяин:* *Moolgarda seheli*

*Типовое местообитание:* прибрежные воды о. Кат Ба, залив Тонкин, северный Вьетнам (20°84'N, 106°59'E)

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* 10 трематод

*Исследованный материал:* 10 экземпляров

*Описание взрослого червя* (Рисунок 13, Таблица 15). Тело мешковидное, кутикула покрыта шипами. Пигментные пятна располагаются в передней части

тела. Ротовая присоска субтерминальная. Длинный префаринкс достигает полового отверстия. Глотка поперечно-овальная, пищевод короткий, кишка мешкообразная. Брюшная присоска располагается преэквиаториально. Семенник одиночный, расположен в задней половине тела. Гермафродитная сумка мешкообразная, расположена на уровне брюшной присоски. Гермафродитный проток имеет подушечки с 2 шипами на склеротизованном основании (Рисунок 13). Половое отверстие располагается по средней линии тела сразу перед брюшной присоской. Яичник сферической формы, прилегает к семеннику. Матка располагается между семенником и брюшной присоской. Желточник состоит из круглых или овальных фолликул. Желточные поля латеральные сзади брюшной присоски. Яйца крупные, с крышечкой, мерицидии имеют два сросшихся пигментных глазка. Экскреторный пузырь Y-образный.

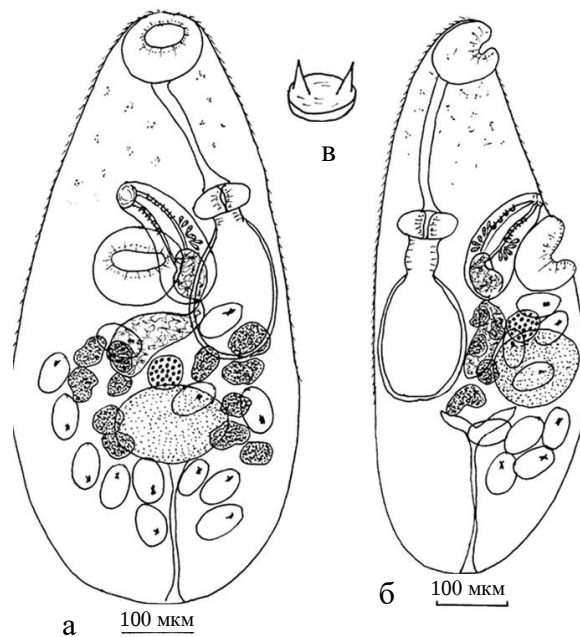


Рисунок 13. Взрослый червь *Unisaccus tonkini* а – вентрально, б – латерально, в – шипы на склеротизированном основании.

### Молекулярные характеристики

Для пяти особей *Unisaccus tonkini* получены нуклеотидные последовательности гена 28S рРНК длиной 1007 п.н. и участка ITS1–5.8S–ITS2 длиной 1287 п.н. были обнаружены 4 переменных сайта для гена 28S рРНК и столько же для участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК. Нуклеотидные последовательности доступны в Международном геномном банке под номерами MF176835 - MF176844.

Таблица 15. Морфометрические признаки (мкм) *Unisaccus tonkini*, *Unisacus halongi* и других представителей подсемейства

| Характеристика                  | <i>Unisaccus tonkini</i> | <i>U. halongi</i><br>Atopkin,<br>Besprozvannykh,<br>Beloded, Ha, Nguyen,<br>Nguyen, 2022 | <i>U. sprengi</i><br>(Martin, 1973) Blasco-<br>Costa, Montero,<br>Gibson, Balbuena,<br>Raga, Kostadinova,<br>2009 | <i>U. spinosus</i><br>Martin, 1973 | <i>U. brisbanensis</i><br>Martin, 1973 | <i>S. indicum</i><br>(Zhukov, 1972)<br>Overstreet, Curran,<br>2005 |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Длина тела                      | 570–847                  | 920–1390                                                                                 | 660–755                                                                                                           | 500–774                            | 0.700–0.840                            | 1000–1200                                                          |
| Ширина тела                     | 262–416                  | 390–500                                                                                  | 135–182                                                                                                           | 146–399                            | 0.260–0.400                            |                                                                    |
| Соотношение<br>длины и ширины % | 39.2–49.0                | 31.7–45.7                                                                                |                                                                                                                   |                                    |                                        |                                                                    |
| Ротовая присоска,<br>длина      | 73–112                   | 92–127                                                                                   | 80–103                                                                                                            | 112–188                            | 73–90                                  | 83–120                                                             |
| Ротовая присоска,<br>ширина     | 73–112                   | 116–154                                                                                  | 90–106                                                                                                            | 130 - 217                          | 64–100                                 | 110–120                                                            |
| Брюшная присоска,<br>длина      | 89–112                   | 96–142                                                                                   | 79–100                                                                                                            | 97–160                             | 80–84                                  | 120–150                                                            |
| Брюшная присоска,<br>ширина     | 92–123                   | 112–150                                                                                  | 80–105                                                                                                            | 97–160                             | 80–84                                  | 140–170                                                            |
| Префаринкс                      | 77–193                   | 227–354                                                                                  | 60                                                                                                                | 195–290                            | 170–280                                | 120–170                                                            |
| Глотка, длина                   | 42–54                    | 77–116                                                                                   | 60–70                                                                                                             | 72–116                             | 22–44                                  | 110–140                                                            |
| Глотка, ширина                  | 73–100                   | 89–135                                                                                   | 60–90                                                                                                             | 130–200                            | 30–68                                  | 80–110                                                             |
| Кишка                           | 31–100                   | 23–58                                                                                    | 180                                                                                                               | 72–116                             | 170–280                                |                                                                    |
| Яичник, длина                   | 42–54                    | 69–116                                                                                   | 73–106                                                                                                            | 43–73                              | 13–18                                  | 62–83                                                              |
| Яичник, ширина                  | 42–46                    | 69–116                                                                                   | 50–80                                                                                                             | 43–73                              | 12–22                                  | 62–83                                                              |
| Семенник, длина                 | 85–116                   | 150–270                                                                                  | 13–246                                                                                                            | 73–206                             | 97–147                                 | 210–300                                                            |
| Семенник, ширина                | 100–154                  | 139–227                                                                                  | 60–77                                                                                                             | 80–210                             | 56–101                                 | 120–140                                                            |
| Гермафродитная<br>сумка, длина  | 123–189                  | 154–231                                                                                  | 220–290                                                                                                           | 203–300                            | 106–166                                |                                                                    |
| Гермафродитная<br>сумка, ширина | 65–96                    | 100–123                                                                                  | 113–133                                                                                                           | 130–260                            | 90–190                                 |                                                                    |
| Яйца, длина                     | 62–69                    | 62–65                                                                                    | 60–77                                                                                                             | 90–106                             | 46–64                                  | 71–79                                                              |
| Яйца, ширина                    | 39–42                    | 50–54                                                                                    | 33–40                                                                                                             | 40–66                              | 24–29                                  | 39–43                                                              |

**Примечание.** Половозрелые черви, обнаруженные в кефалях из Вьетнама по топологии органов и ряду других морфологических признаков: одиночному семеннику, мешковидной кишке и вооруженному гермафродитному протоку, соответствуют диагнозу рода *Unisaccus*. По показателям метрических характеристик вьетнамские трематоды близки к *U. spinosus*, *U. brisbanensis* и *U. overstreeti*. Однако между этими видами и *Unisaccus tonkini* присутствует и ряд отличий в размерах ротовой и брюшной присосок, а также в соотношении этих величин, в размерах яичника и гермафродитной сумки (Таблица 15). На основании морфометрических данных, мы считаем обнаруженных нами половозрелых червей представителями отдельного вида рода *Unisaccus*, которому присвоено название *Unisaccus tonkini*.

***Unisaccus halongi* Atopkin, Besprozvannykh, Beloded, Ha, Nguyen, Nguyen, 2022**

*Типовой хозяин:* *Moolgarda seheli* Fabricius, 1775

*Типовое местообитания:* прибрежные воды о. Кат Ба, залив Тонкин, северный Вьетнам (20°84'N, 106°59'E)

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* 1-12 трематод

*Исследованный материал:* 6 экземпляров

*Описание взрослого червя* (Рисунок 14, Таблица 15). Тело удлинненное, с узкой передней частью, тегумент с игольчатыми шипами. Пигментные глазки рассредоточены по передней части тела. Ротовая присоска субтерминальная поперечновытянутая овальная. Префаринкс длинный, немного не достигает брюшной присоски или достигает уровня передней половины брюшной присоски. Глотка на уровне брюшной присоски, шаровидная, большая, немного меньше ротовой присоски. Пищевод короткий. Кишка одиночная, мешковидная, толстостенная, в средней и частично задней трети тела. Брюшная присоска крупнее ротовой на границе передней и задней трети тела. Семенник одиночный, в заднем конце тела неправильной формы. Гермафродитная сумка овальная, находится на уровне брюшной присоски. Передний конец гермафродитной сумки

с мышечным сфинктером. Гермафродитный проток имеет подушечки с 2 шипами на склеротизованном основании. Наружный семенной пузырек мешковидный. Внутренний семенной пузырек овальной формы. Размер семенных пузырьков зависит от количества половых продуктов. Половое отверстие открывается по средней линии тела непосредственно перед брюшной присоской. Яичник круглый, прилегает к переднему краю семенника. Матка короткая, между передним краем семенника и гермафродитной сумкой. Метратерм равен длине гермафродитного протока. Яйца многочисленные, светло-желтые, без эмбрионов, с крышечками. Желточник состоит из крупных, удлинённых, широких фолликулов, плотно соприкасающихся друг с другом. Желточные поля между брюшной присоской и задним концом тела сливаются по средней линии тела. Экскреторный пузырь I-образной формы (Рисунок 14).

### **Молекулярные характеристики**

Для трех особей *U. halongi* получены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 28S рРНК и участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК длиной 1240 п.н. и 972 п.н., соответственно. Последовательности из обоих наборов данных были идентичными. Нуклеотидные последовательности доступны в Международном геномном банке под номерами: OK644190-OK644192, OK644196-OK644198.

**Примечание.** По ряду морфологических признаков, *Unisaccus halongi* имеет общие морфометрические признаки с представителями родов *Paraunisaccoides* и *Skrjabinolecithum*. Однако в сравнении с *Paraunisaccoides lobolectithum*, они отличаются меньшей длиной тела при схожей ширине тела, более широкой брюшной присоской, меньшей длиной префаринкса и пищевода и меньшей длиной гермафродитной сумки, при ее большей ширине. Среди представителей *Skrjabinolecithum*, особи *Unisaccus halongi* имеют наибольшее сходство с *S. vitellosum* и *S. indicum*, отличаясь при этом строением гермафродитного протока и метрическими характеристиками, а так же размерами префаринкса и строением желточников. Наряду с этим, черви из нашего материала обладают как общими, так и необычными морфологическими признаками для *Unisaccus*. Сходство этих червей проявляется в строении половой и пищеварительной систем. Различия

наблюдались по таким характеристикам как: форма тела, наличие эмбрионов в яйцах, форма желточных фолликулов, а так же метрическими характеристиками (Таблица 15). Результаты молекулярного анализа демонстрируют принадлежность трематод от *Moolgarda seheli* подсемейству Waretremiinae и указывают на близкое родство с *Unisaccus tonkini* (см главу 3.5) (Atopkin et al., 2022)

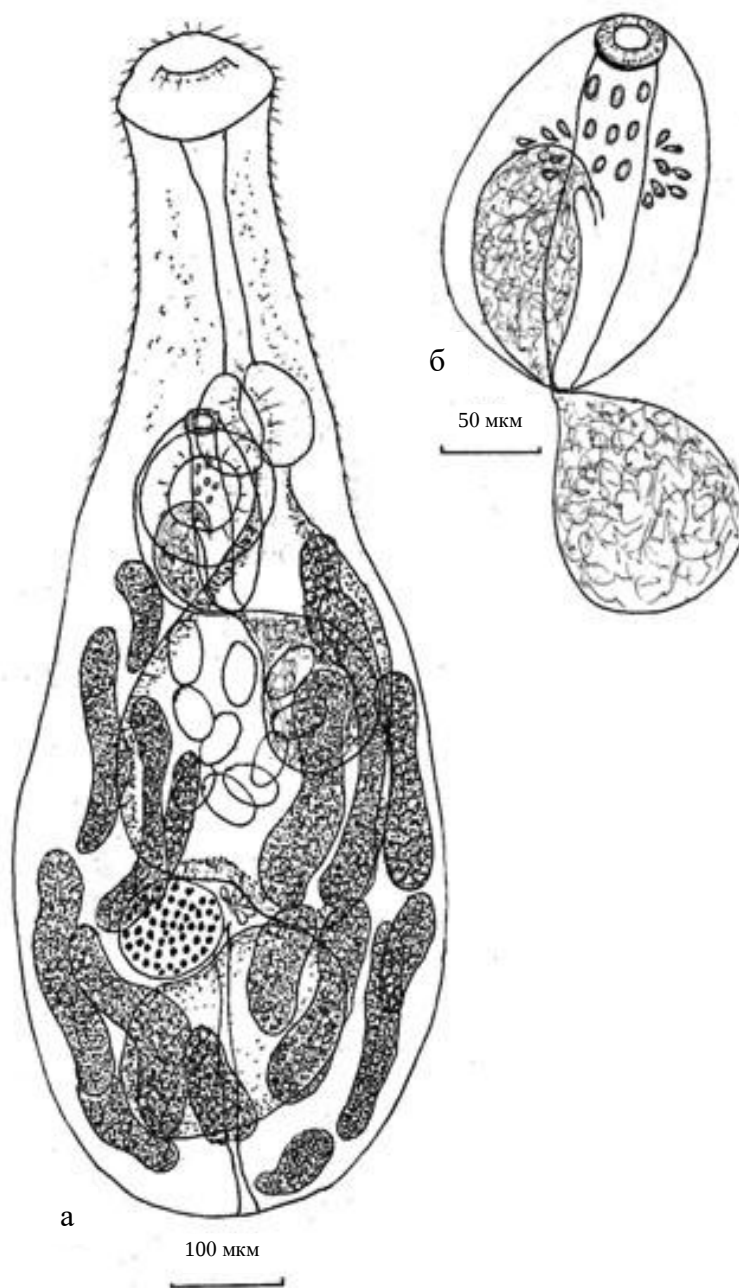


Рисунок 14 Взрослый червь *Unisaccus halongi* а - взрослый червь, б - сумка цирруса

**Род:** *Paraunisaccoides* Martin, 1973

**Типовой вид:** *Paraunisaccoides lobolectithum* Martin, 1973

### **Диагноз рода**

Тело овальное, веретеновидное или удлиненное. Пигментные глазки расположены диффузно. Ротовая присоска субтерминальная. Брюшная присоска крупнее ротовой присоски, располагается в передней половине тела. Префаринкс длинный, достигает уровня брюшной присоски или заходит за ее задний край. Глотка круглая или поперечно-овальная. Пищевод короткий, слабо выраженный. Кишка мешковидная. Семенник одиночный, располагается в задней трети тела. Гермафродитная сумка овальная с мускулистым сфинктером на переднем конце. Наружные семенные пузырьки мешковидной или иной формы в зависимости от наполненности половыми продуктами. Внутренние семенные пузырьки удлиненные. Гермафродитные протоки с подушечками или без них. Половое отверстие находится на средней линии тела непосредственно перед брюшной присоской. Яичник округлый или поперечно-овальный, расположен непосредственно перед семенником. Матка короткая, локализуется между передним краем семенника и гермафродитной сумкой. Метратерм короткий, тонкостенный. Яйца немногочисленные, без эмбрионов, имеют крышечку. Тельца Мелиса расположены слева от яичника. Желточники состоят из удлиненных тонких фолликулов. Желточные поля могут достигать уровня заднего края брюшной присоски и до заднего конца тела. Экскреторный пузырь I-образной формы с мышечным сфинктером или без него.

***Paraunisaccoides elegans* Atopkin, Besprozvannykh, Beloded, Ha, Nguyen, Nguyen, 2022**

*Типовой хозяин:* *Planiliza subviridis* Valenciennes, 1836.

*Типовое местообитание:* прибрежные воды о. Кат Ба, залив Тонкин, северный Вьетнам (20°84'N, 106°59'E)

*Локализация:* Кишечник

*Интенсивность инвазии:* 1-5 трематод

*Исследованный материал:* 6 экземпляров

*Описание взрослого червя* (Рисунок 15, Таблица 15). Тело удлинненное, с узкой передней частью, тегумент с игольчатыми шипами. Пигментные глазки рассредоточены по передней половине тела. Ротовая присоска субтерминальная. Префаринкс длинный, достигает уровня брюшной присоски или немного позади брюшной присоски. Глотка округлая или поперечно овальная. Пищевод короткий, плохо очерченный. Кишка мешковидная в середине задней половины тела. Брюшная присоска крупнее ротовой. Семенник одиночный, в заднем конце тела, неправильной формы, с передним углублением. Гермафродитная сумка овальной формы, на уровне брюшной присоски. Передний конец гермафродитной сумки с мышечным сфинктером. Подушечки у гермафродитного протока не выявлены. Половое отверстие открываются по средней линии тела непосредственно перед брюшной присоской. Яичник округлый или поперечно-овальный, прилегает к переднему краю семенника. Матка короткая, между передним краем семенника и гермафродитной сумкой. Метратерм короткий, тонкостенный. Яйца, немногочисленны светло-желтые, без эмбрионов, с крышечками. Желточник состоит из удлинненных тонких фолликулов. Желточные поля могут доходить до уровня заднего края брюшной присоски и до заднего конца тела, сливаться по средней линии тела. Экскреторный пузырь I-образной формы с мышечным сфинктером (Рисунок 15).

### Молекулярные характеристики

Для четырех особей *Paraunisaccoides elegans* получены нуклеотидные последовательности длиной 1291 и 1604 п.н. для фрагментов гена 28S рРНК и ITS1 - 5.8S - ITS2 рДНК, соответственно. Между ними были обнаружены переменные сайты: три (0.23%) для фрагмента 28S рРНК и девятнадцать (1.18%) для ITS1 - 5.8S - ITS2 рДНК. Нуклеотидные последовательности доступны в Международном генном банке под номерами: KY501639–KY501644.

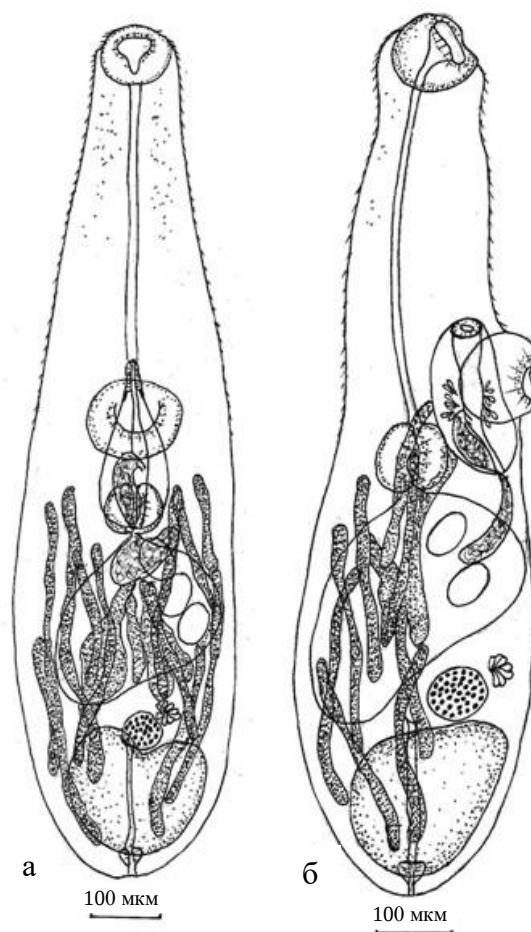


Рисунок 15. Взрослый червь *Paraunisaccoides elegans* а - вентрально, б - латерально

Таблица 16. Морфометрические характеристики (мкм) *Paraunisaccoides elegans* и других представителей подсемейства

|                              | <i>Paraunisaccoides elegans</i> | <i>U. halongi</i> | <i>Skrjabinolecithum lobolectum</i> | <i>S. vitellosum</i> |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Длина тела                   | 1124-1232                       | 920-1390          | 1850 - 2070                         | 510–790              |
| Ширина тела                  | 323-370                         | 390-500           | 266 - 406                           | 140–300              |
| Соотношение длины и ширины % | 26.0-32.9                       | 31.7-45.7         |                                     |                      |
| Ротовая присоска, длина      | 77-104                          | 92-127            | 96 - 112                            | 50–80                |
| Ротовая присоска, ширина     | 92-112                          | 116-154           | 100 - 112                           | 59–90                |
| Брюшная присоска, длина      | 112-139                         | 96-142            | 93 - 143                            | 56–74                |
| Брюшная присоска, ширина     | 127-135                         | 112-150           | 78 - 156                            | 56–74                |
| Префаринкс                   | 377-566                         | 227-354           | 426 - 684                           | 90–109               |
| Глотка, длина                | 77-116                          | 77-116            | 109 - 112                           | 44–80                |
| Глотка, ширина               | 85-123                          | 89-135            | 131 - 137                           | 59–110               |
| Кишка                        | 0-154                           | 23-58             | 112 - 249                           | 60                   |
| Яичник, длина                | 46-77                           | 69-116            | 109 - 140                           | 31–62                |
| Яичник, ширина               | 54-77                           | 69-116            | 100 - 109                           | 31–62                |
| Семенник, длина              | 162-219                         | 150-270           | 239 - 345                           | 75–165               |
| Семенник, ширина             | 154-235                         | 139-227           | 168 - 202                           | 50–90                |
| Гермафродитная сумка, длина  | 181-270                         | 154-231           | 258 - 286                           | 90                   |
| Гермафродитная сумка, ширина | 104-173                         | 100-123           | 96 - 118                            | 50                   |
| Яйца, длина                  | 62-73                           | 62-65             | 71–93                               | 59–65                |
| Яйца, ширина                 | 42-50                           | 50-54             | 56–59                               | 42                   |

**Примечание.** Согласно ранней классификации (Overstreet, Curran, 2005), черви от *Planiliza subviridis* имеют общее морфологическое сходство с представителями рода *Skrjabinolectithum* - *S. lobolectithum*, *S. vitellosum*, у которых, как и у червей в нашем материале одна слепая кишка, отличаясь, при этом, по морфометрическим признакам (размеры тела, присосок, глотки, семенника, гермафродитной сумки). Наибольшее сходство наблюдалось с трематодами описанными от *Mugil cephalus* в Австралии как *Paraunisaccoides lobolectithum* (позднее вид был сведен в синоним *Skrjabinolectithum lobolectithum*), однако по ряду метрических параметров (размеры тела, яичника и яиц), а так же отсутствию подушечек гермафродитного протока, вьетнамские черви отличаются от австралийских. Несмотря на то, что трематоды имеют морфологическое сходство и были обнаружены у кефалей из относительно близких географических областей, морфометрические отличия и отсутствие молекулярных данных по австралийским образцам не позволяют отнести этих трематод к одному виду.

Филогенетический анализ показал, что вьетнамские черви относятся к Waretrematinae и образуют близкородственные связи с родом *Unisaccus*, а не с видами рода *Skrjabinolectithum*. Значения генетических дистанций между вьетнамскими трематодами и родами *Unisaccus* и *Skrjabinolectithum* соответствуют уровню межродовых различий и сопоставимы с межродовыми дистанциями других представителей семейства Harporidae:

Учитывая морфологическое сходство вьетнамских трематод с *Paraunisaccoides lobolectithum* и значительный уровень генетической дифференциации от представителей рода *Skrjabinolectithum*, синонимизация родов *Paraunisaccoides* и *Skrjabinolectithum* признана необоснованной. На этом основании род *Paraunisaccoides* Martin, 1973 восстановлен с типовым видом *P. lobolectithum*, в который включен и новый вид *Paraunisaccoides elegans*, описанный от вьетнамской кефали (Atopkin et al., 2022).

## Результаты молекулярных исследований трематод родов *Unisaccus* и *Paraunisaccoides*

Результаты анализа филогенетических связей, реконструированных как на основании частичных последовательностей 28S рДНК (1050 п.н.), так и на основе комбинированных данных секвенирования ITS2 рДНК и 28S рДНК (суммарно 1460 п.н.), подтвердили принадлежность исследуемых видов *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* к подсемейству Waretrematinae (Рисунок 16).

Трематоды, описанные нами как новые виды, *Unisaccus tonkini* и *Unisaccus halongi* (Besprozvannykh et al., 2017) оказались наиболее близкими по отношению друг к другу, значения р-дистанций между этими двумя родами составили  $2.59 \pm 0.52\%$  и  $3.54 \pm 0.67\%$  по данным секвенирования 28S рДНК и ITS2 рДНК, соответственно, что сопоставимо с межвидовыми значениями для других гаплопорид:  $0.43 \pm 0.19\%$  to  $4.85 \pm 0.65\%$  по данным секвенирования 28S рДНК и  $2.15 \pm 0.56\%$  to  $5.86 \pm 0.87\%$  по данным секвенирования ITS2 рДНК (Blasco-Costa et al., 2009; Besprozvannykh et al., 2015; Atopkin et al., 2018; Atopkin et al., 2020a; Andrade-Gómez et al., 2019; Andrade-Gómez, García-Valera, 2021). Эти результаты подтверждают принадлежность изучаемых трематод к разным видам рода *Unisaccus*, что согласуется с данными по морфологии. Генетические дистанции, рассчитанные по данным последовательности 28S рДНК между *Unisaccus* и другими родами разных подсемейств, варьировали от  $12.2 \pm 0.98\%$  (*Spiritestis herveyensis*, Waretrematinae) до  $14.3 \pm 1.1\%$  (*S. spassskii*, Waretrematinae). Средние значения генетических р-дистанций между *Unisaccus* и различными подсемействами Harpororidae варьировали от  $13.5 \pm 1.003\%$  (Forticulcitinae) до  $13.8 \pm 0.932\%$  (Chalcinotrematinae) в пределах стандартной ошибки. Генетическая дифференциация с использованием данных последовательности рДНК ITS2 между *Unisaccus* и другими родами Harpororidae варьировала от  $13.4 \pm 1.7\%$  (*Spiritestis* и *Intromugil*, Waretrematinae) до  $19.6 \pm 2.1\%$  (*Lecithobotrys*, Harpororinae). Средние значения р-дистанций между *Unisaccus* и различными подсемействами Harpororidae варьировали от  $14.1 \pm 1.7$  (Waretrematinae) до  $19.3 \pm 2.04\%$  (Harpororinae). Эти данные показывают генетическую близость *Unisaccus* к

Waretrematinae лучше, чем данные по 28S рДНК. Эти значения соответствуют уровню дивергенции, рассчитанному для разных подсемейств Harporidae:  $8.3 \pm 0.8\%$  до  $12.2 \pm 0.78\%$  и  $15.7 \pm$  от  $1.45\%$  до  $18.5 \pm 1.65\%$  по данным о последовательностях 28S и ITS2 рДНК соответственно. Филогенетические топологии дерева, основанные на данных о частичной последовательности гена 28S рДНК и объединенных последовательностей ITS2 + 28S рДНК, показали, что трематоды *Unisaccus* близки к представителям Waretrematinae.

Значения p-дистанций и филогенетические реконструкции показывают, что *Unisaccus* принадлежит к большой гетерогенной группе, включающей различных представителей Waretrematinae. Другие подсемейства, включенные в наш анализ, Harporinae и Forticulcitinae, представляют собой более компактные отдельные кластеры с относительно ограниченным диапазоном значений p-расстояний. Таким образом, наши молекулярные данные можно интерпретировать, по крайней мере, двумя способами. Род *Unisaccus* можно рассматривать как члена подсемейства Waretrematinae, поскольку полифилия этой группы трематод, упомянутой ранее (Atopkin et al., 2015), была разрешена. Однако, учитывая высокую молекулярную дифференцировку *Unisaccus* и других гаппопорид, нельзя исключать возможности того, что род *Unisaccus* принадлежит к отдельному подсемейству. Окончательные выводы можно будет сделать с помощью дополнительных морфологических и молекулярных исследований близкородственных видов *Unisaccus*.

Трематоды, принадлежащие к роду *Paraunisaccoides* и описанные нами как *P. elegans* на филогенетическом древе образуют сестринскую группу по отношению к кладе, объединяющей виды рода *Unisaccus* (Рисунок 16, 17). Генетическая дифференциация между этими двумя кладами составила  $6.53 \pm 0.76\%$  –  $7.05 \pm 0.5\%$  по данным секвенирования 28S рДНК и  $7.94 \pm 0.95\%$  –  $8.05 \pm 0.67\%$  по данным секвенирования ITS2 рДНК. Эти цифры сопоставимы со значениями межродовой дифференциации для других гаппопорид:  $3.62 \pm 0.56\%$  –  $13.93 \pm 1.03\%$  и  $4.21 \pm 0.73\%$  –  $16.38 \pm 1.35\%$  для Waretrematinae,  $5.9 \pm 0.62\%$  и  $8.33 \pm 0.91\%$  для Pseudoharporinae,  $6.13 \pm 0.68\%$  и  $10.11 \pm 1.08\%$  для

Forticulcitinae по данным секвенирования 28S рДНК и ITS2 рДНК, соответственно (Blasco-Costa et al., 2009; Atopkin et al., 2018; Andrade-Gómez, García-Valera, 2021). Полученные результаты подтверждают принадлежность Вьетнамских трематод от кефалей *Planiliza subviridis* к отдельному самостоятельному роду (Таблица 17).

Таблица 17. Генетические р-дистанции между видами рода *Unisaccus*, *Paraunisaccoides elegans* n. sp. и разными подсемействами Haplorporidae на основе последовательностей 28S рДНК. Ниже диагонали значения р-дистанции (%); над диагональю, значения стандартной ошибки (%)

|    | Таксон                          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11   |
|----|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1  | <i>Unisaccus tonkini</i>        |       | 0.50  | 0.74  | 0.83  | 0.93  | 1.02  | 0.91  | 0.92  | 1.10  | 1.10  | 1.02 |
| 2  | <i>Unisaccus halongi</i>        | 2.80  |       | 0.73  | 0.80  | 0.93  | 1.00  | 0.90  | 0.94  | 1.10  | 1.10  | 1.02 |
| 3  | <i>Paraunisaccoides elegans</i> | 7.05  | 6.53  |       | 0.75  | 0.88  | 1.02  | 0.87  | 0.90  | 1.11  | 1.11  | 1.00 |
| 4  | Waretrematinae                  | 13.22 | 12.70 | 11.97 |       | 0.71  | 0.83  | 0.72  | 0.74  | 0.87  | 0.91  | 0.86 |
| 5  | Forticulcitinae                 | 13.95 | 13.68 | 12.74 | 12.11 |       | 0.84  | 0.75  | 0.66  | 0.85  | 0.97  | 0.88 |
| 6  | Pseudohaplorporinae             | 14.37 | 14.72 | 14.17 | 13.33 | 11.37 |       | 0.76  | 0.81  | 0.91  | 1.09  | 0.92 |
| 7  | Haplorporinae                   | 13.65 | 13.63 | 13.61 | 12.98 | 11.04 | 10.46 |       | 0.69  | 0.83  | 0.94  | 0.84 |
| 8  | Chalcinotrematinae              | 12.84 | 12.59 | 11.89 | 11.83 | 8.93  | 10.57 | 9.81  |       | 0.91  | 1.00  | 0.87 |
| 9  | Megasoleninae                   | 15.95 | 15.50 | 15.72 | 14.11 | 11.90 | 12.90 | 12.85 | 12.16 |       | 0.94  | 0.85 |
| 10 | Hapladeninae                    | 17.65 | 18.00 | 17.96 | 16.20 | 14.78 | 16.46 | 14.61 | 15.20 | 12.98 |       | 0.99 |
| 11 | Cadenatellinae                  | 15.00 | 14.71 | 15.07 | 14.21 | 12.16 | 12.97 | 12.30 | 11.82 | 9.41  | 13.94 |      |

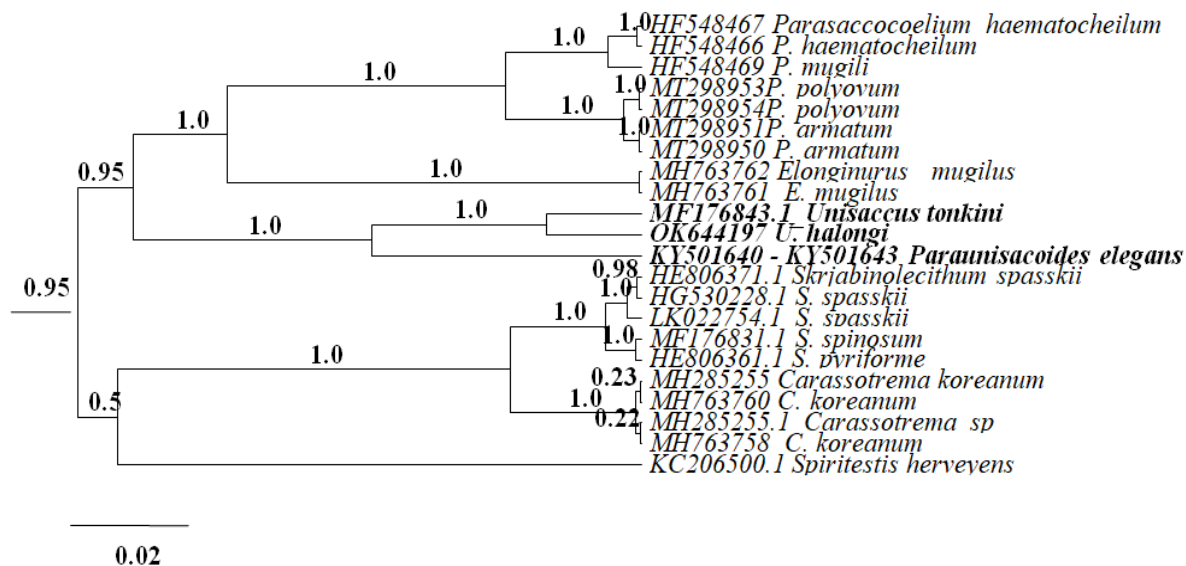


Рисунок 16. Фрагмент филогенетического дерева семейства Haplorporidae, реконструированного на основе частичных последовательностей 28S рДНК с использованием Байесовского алгоритма. Узловые числа указывают на апостериорные вероятности. Описанные и обоснованные виды *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* выделены жирным шрифтом.

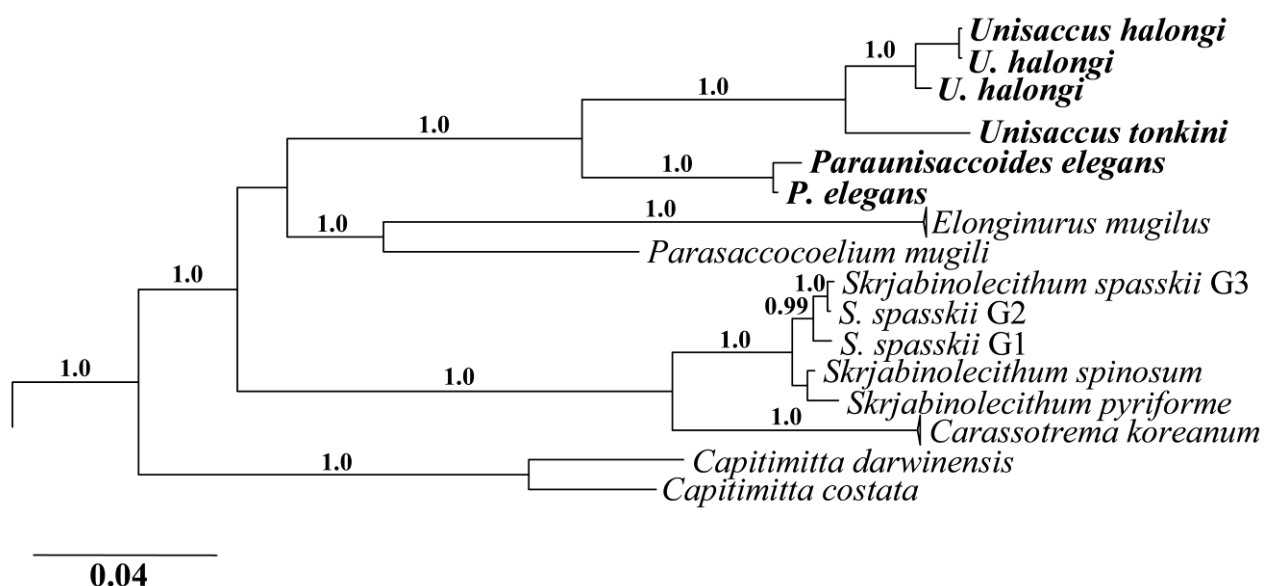


Рисунок 17. Фрагмент филогенетического дерева семейства Harpororidae, реконструированного на основе объединенных последовательностей ITS2 и 28S рДНК с использованием Байесовского алгоритма. Узловые числа указывают на апостериорные вероятности. Описанные и обоснованные виды *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* выделены жирным шрифтом.

### 3.4. Морфологические и молекулярные критерии в систематике Harpororidae

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей важным критерием межвидовой дифференциации является наличие фиксированных нуклеотидных замен, что подразумевает присутствие по одному и тому же вариабельному сайту разных азотистых оснований, уникальных для каждого вида. Внутривидовые вариации по такому сайту для фиксированных замен в данном случае недопустимы. Следующий критерий – дифференциация нуклеотидных последовательностей двух сравниваемых видов, выраженная через значения попарных генетических дистанций (р – дистанций). В расчет данного параметра включены все вариабельные сайты, по которым имеются фиксированные замены и допускаются внутривидовые вариации.

Для трематод Harpororidae в литературе приводятся значения генетической дифференциации по молекулярному маркеру – фрагменту 28S рДНК для четырех видов рода *Saccocoelium* (Harpororinae) гельминтофауны кефалевых рыб

средиземноморской фауны, варьирующие в пределах от 0.9 до 4.8%, для двух видов рода *Dicrogaster* – 4.6% (Blasco-Costa et al., 2009); для видов родов *Capitimita* и *Intromugil* фаун Индо - Западной Пацифики и Атлантики, соответственно - от 2.7 до 2.8% (Pulis et al., 2013; Pulis, Overstreet, 2013).

В нашей работе на примере видов рода *Parasaccocoelium* по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК показан минимальный порог межвидовой дифференциации, составляющий  $0.73 \pm 0.26\%$  для пары видов *P. mugili* и *P. haematocheilum*. Эти виды значительно отличаются друг от друга морфологически, что не вызывает сомнений их валидности. Приведенное значение дифференциации отражает наличие семи фиксированных нуклеотидных замен между последовательностями 28S рДНК длиной 956 п.н. двух указанных видов трематод. Значение дифференциации по данному молекулярному маркеру между *P. polyovum* и недавно описанным видом *Parasaccocoelium armatum* Atopkin, Besprozvannykh, Ha, Nguyen, Nguyen, 2020 составляет  $0.37 \pm 0.19\%$ , что, в пределах стандартной ошибки, соответствует минимальному уровню межвидовой дифференциации для рода *Parasaccocoelium*, указанному выше. Кроме того, между последовательностями 28S рДНК *P. polyovum* и *P. armatum* выявлено четыре фиксированные замены – две транзиции (Т / С, А / G) и две трансверсии (Т / А, Т / G). Максимальный порог межвидовых значений в пределах рода *Parasaccocoelium*, исходя из наших данных, составляет 3.2% между видами *P. haematocheilum* и *P. polyovum*.

Результаты исследования трематод *Skrjabinolecithum spasskii* юга Дальнего Востока России и Вьетнама демонстрируют другой характер согласованности между морфологической и молекулярной дифференциацией. Морфологически сходные особи трематод *S. spasskii* из нескольких географически удаленных точек сбора по данным секвенирования 28S рДНК подразделяются на три группы, каждая из которых характеризуется уникальным вариантом последовательности, отличающихся друг от друга фиксированными заменами; дифференциация между этими группами варьировала от 0.1 до 0.5%. Эти цифры укладываются в минимальные значения межвидового диапазона для *Harporidae*, поэтому

выявленные группы трематод могут претендовать на статус отдельных видов по критерию генетических р-дистанций. Кроме того, другой критерий - наличие от 1 до 5 фиксированных замен (Таблица 13) между последовательностями 28S рДНК выявленных групп *S. spasskii*, также свидетельствует в пользу межвидовой дифференциации этих трематод. Однако морфологический критерий не даёт оснований для такого вывода, поскольку черви из разных, географически удаленных регионов по морфологическим критериям не дифференцируются (Беспрозванных и др., 2015). Тем не менее, не исключено, что при более скрупулезном изучении этих червей могут быть выявлены морфологические особенности, разделяющие особей *S. spasskii* на отдельные виды. Другие представители рода *Skrjabinolecithum*, *S. pyriforme* и *S. spinosum*, описанные и генотипированные в рамках данной работы, значительно отличаются друг от друга морфологически, что указано выше, и, в то же время, демонстрируют значительно низкий уровень генетических дистанций по данным секвенирования 28S рДНК, значение которых между этими двумя видами составляет  $0.12 \pm 0.1\%$ . При этом, между последовательностями наблюдается одна фиксированная транзиция Т / С. В данном случае морфологический критерий согласуется с одним из молекулярных критериев, а именно – с наличием фиксированных замен, указывая на достаточность одной такой замены для делимитации этих двух видов. Тем не менее, значение генетических дистанций между этими видами не укладывается в диапазон межвидовых значений, известный для гаплопорид (Blasco-Costa et al., 2009; Besprozvannykh et al., 2015; Atopkin et al., 2018; Andrade-Gómez et al., 2017; 2021).

В целом, комплексный анализ морфологических и молекулярных характеристик трематод рода *Skajabinolecithum* приводит к двум взаимоисключающим результатам. С одной стороны, морфологически идентичные черви *S. spasskii* из разных точек сбора характеризуются наличием до пяти фиксированных нуклеотидных замен в последовательностях 28S рДНК. С другой стороны, *S. pyriforme* и *S. spinosum* однозначно относимые к разным видам по морфологическим критериям (Besprozvannykh et al., 2017), отличаются друг от

друга одной фиксированной заменой в последовательностях 28S рДНК. При этом в обоих случаях значения генетических дистанций либо не достигают, либо достигают минимальных значений межвидового уровня дифференциации, выявленного для гаплогорид по маркеру 28S рДНК.

Виды рода *Unisaccus*, *U. tonkini* и *U. halongi*, также описанные и генотипированные в рамках настоящей работы, характеризуются морфологическими признаками, как характерными, так и не характерными для представителей рода *Unisaccus*. Так, для червей из настоящей работы и видов *Unisaccus*, описанных ранее другими авторами (Martin, 1973; Zhukov, 1972), наблюдается сходство в структуре половой и пищеварительной систем. Наряду с этим, наблюдаются и морфологические различия в форме тела и желточных фолликул (Рисунок 13, 14), а также наличие либо отсутствие эмбрионов в яйцах (Atopkin et al., 2022). Тем не менее, значения генетических дистанций между *U. tonkini* и *U. halongi* составляют  $2.59 \pm 0.52\%$  и  $3.54 \pm 0.67\%$  по данным секвенирования 28S рДНК и ITS2 рДНК, соответственно. Эти значения укладываются в межвидовой диапазон дистанций Harpororidae, что указывает на принадлежность двух рассматриваемых видов к одному роду. Между последовательностями 28S рДНК обнаружено 29 фиксированных замен, включая 13 транзиций и 16 трансверсий. Генетические дистанции между видами *Unisaccus* и *Paraunisaccoides elegans*, описанному нами от кефалевых рыб Вьетнама, по данным частичного секвенирования варьируют от  $6.53 \pm 0.76\%$  до  $7.05 \pm 0.5\%$ , что однозначно указывает на родовой уровень дифференциации, учитывая от 66 до 69 фиксированных замен между *P. elegans* и двумя видами *Unisaccus*.

Результаты, полученные в рамках настоящего исследования, показывают, что видовые молекулярные характеристики в пределах Harpororidae на фоне морфологических различий неоднородны и не могут быть сведены к строгим границам таксономических значений, однозначно характеризующим межвидовой уровень дифференциации. Это отражается в высокой вариативности значений р-дистанций между разными видами в пределах того или иного рода изученных подсемейств Harpororidae. Это также наглядно прослеживается и на

филогенетических реконструкциях (Рисунок 15, 16). Тем не менее, полученные нами результаты и их сравнительный анализ с данными других авторов позволяют установить условные границы молекулярных показателей межвидовой дифференциации внутри некоторых родов Waretrematinae. А именно, межвидовая дифференциация внутри рода *Parasaccocoelium* по нашим данным варьирует по 28S от  $0.37 \pm 0.19\%$  до  $4.15 \pm 0.74\%$ , внутри рода *Skrjabinolectithum* от  $0.12 \pm 0.1\%$  до  $1.03 \pm 0.28\%$ , а для рода *Unisaccus* составляет  $2.59 \pm 0.52\%$ . Однако не исключено, что с появлением молекулярных данных для других видов указанных родов Harpororidae представленные диапазоны значений будут скорректированы.

Для объективизации наших выводов относительно согласованности между морфологическими и молекулярными критериями, используемыми в таксономии гаплопорид, мы провели количественный корреляционный анализ между морфометрическими признаками и молекулярными показателями для каждой пары видов на примере двух родов Harpororidae: *Parasaccocoelium* и *Skrjabinolectithum* (Таблица 18). Причем для сравнения с молекулярными показателями, включая генетические дистанции и количество фиксированных нуклеотидных замен, мы использовали как общее количество морфометрических признаков, так и несколько метрических показателей по отдельности (Таблица 19, 20).

В результате было установлено, что между общим количеством морфологических признаков и молекулярными показателями, использованными для делимитации каждой пары видов внутри обоих родов, отсутствуют статистически значимые корреляции (Таблица 21, 22). Однако результаты корреляционного анализа между молекулярными показателями и отдельными метрическими параметрами обнаружили наличие статистически значимых корреляций внутри каждого рода гаплопорид, которые оказались родоспецифическими. Так, внутри рода *Parasaccocoelium* выявлены статистически значимые корреляции между молекулярными показателями и разницей значений соотношения ширины брюшной и ротовой присосок (Таблица 19, Рисунок 18). Для рода *Skrjabinolectithum* статистически значимые корреляции с

молекулярными показателями выявлены средней длины тела взрослых червей, размеров семенника и яичника (Таблица 20, Рисунок 20, 21, 22). Полученные результаты указывают на согласованность молекулярной дифференциации видов трематод и их различий по некоторым индивидуальным морфометрическим показателям, причем внутри каждого из двух проанализированных родов эта согласованность наблюдается для разных метрических характеристик. Поэтому на данном этапе можно заключить, что выявленные значимые корреляции между морфологическими и молекулярными критериями, скорее всего не имеют системного характера, а представляют исключительно индивидуальный для каждого рода случай согласованности. Тем не менее, для подтверждения наших выводов необходим значительно больший объем данных по разным родам как минимум внутри *Harpororidae*.

Отдельно мы проанализировали корреляции между генетическими дистанциями и количеством фиксированных замен внутри каждого рода. В результате выявлены положительные значимые корреляции между этими двумя показателями (Таблица 21, 22). Этот результат подтверждает, что фиксированные замены фрагмента гена 28S рРНК имеют большое значение для делимитации видов трематод внутри того или иного рода.

Таблица 18. Межвидовые различия у исследованных видов Waretrematinae (Narploridae) на основании морфологического и молекулярного критериев.

| Виды                                          | Морфологический критерий<br>(дифференцирующие признаки)                                                                                                                                                                                               | Молекулярные критерии (28S рДНК) |                            |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|                                               |                                                                                                                                                                                                                                                       | Фикс. замены <sup>1</sup>        | d±std.err., % <sup>1</sup> |
| род <i>Parasaccocoelium</i>                   |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                  |                            |
| <i>P. armatum</i> / <i>P. polyovum</i>        | <ul style="list-style-type: none"><li>• длина гермафродитной бурсы</li><li>• вооружение герм.бурсы есть/нет</li><li>• положение желточников</li><li>• длина желточников</li><li>• размеры яиц</li></ul>                                               | 4                                | 0.37±0.19                  |
| <i>P. mugili</i> / <i>P. haematocheilum</i>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• форма семенника</li><li>• размеры тела</li><li>• размеры ротовой присоски</li><li>• размеры брюшной присоски</li><li>• размеры яичника</li><li>• размеры семенника</li><li>• количество яиц в матке</li></ul> | 7                                | 0.73±0.26                  |
| <i>P. mugili</i> / <i>P. polyovum</i>         | <ul style="list-style-type: none"><li>• форма семенника</li><li>• размеры тела</li><li>• размеры ротовой присоски</li><li>• размеры брюшной присоски</li><li>• размеры яичника</li><li>• размеры семенника</li><li>• количество яиц в матке</li></ul> | 34                               | 4.02±0.71                  |
| <i>P. armatum</i> / <i>P. mugili</i>          | <ul style="list-style-type: none"><li>• длина гермафродитной бурсы ,</li><li>• вооружение герм.бурсы есть/нет</li><li>• положение желточников</li><li>• длина желточников</li><li>• размеры яиц</li></ul>                                             | 34                               | 3.14±0.52                  |
| <i>P. haematocheilum</i> / <i>P. polyovum</i> | <ul style="list-style-type: none"><li>• длина тела</li><li>• длина гермафродитной бурсы</li><li>• размеры ротовой присоски</li><li>• размеры желточников</li></ul>                                                                                    | 37                               | 4.15±0.74                  |
| <i>P. armatum</i> / <i>P. haematocheilum</i>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• длина гермафродитной бурсы</li><li>• вооружение герм.бурсы есть/нет</li><li>• положение желточников</li><li>• длина желточников</li><li>• размеры яиц</li></ul>                                               | 37                               | 3.43±0.54                  |
| Род <i>Skrjabinoecithum</i>                   |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                  |                            |
| <i>S. spasskii</i> G1 / G2 <sup>2</sup>       | —                                                                                                                                                                                                                                                     | 5                                | 0.5±0.22                   |
| <i>S. spasskii</i> G1 / G3 <sup>2</sup>       | —                                                                                                                                                                                                                                                     | 4                                | 0.4±0.2                    |
| <i>S. spasskii</i> G2 / G3 <sup>2</sup>       | —                                                                                                                                                                                                                                                     | 1                                | 0.1±0.1                    |
| <i>S. spasskii</i> / <i>S. pyriforme</i>      | <ul style="list-style-type: none"><li>• форма и пропорции тела</li><li>• ширина тела</li><li>• размеры ротовой присоски</li><li>• размеры фаринкса</li><li>• размеры яиц</li></ul>                                                                    | 12                               | 0.95±0.27                  |
| <i>S. spasskii</i> / <i>S. spinosum</i>       | <ul style="list-style-type: none"><li>• нет/есть вооружение герм.бурсы</li></ul>                                                                                                                                                                      | 13                               | 1.03±0.28                  |
| <i>S. pyriforme</i> / <i>S. spinosum</i>      | <ul style="list-style-type: none"><li>• форма и пропорции тела</li><li>• размер фаринкса</li></ul>                                                                                                                                                    | 1                                | 0.12±0.1                   |
| Род <i>Unisaccus</i>                          |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                  |                            |
| <i>U. tonkini</i> / <i>U. halongi</i>         | <ul style="list-style-type: none"><li>• форма тела</li><li>• форма желточных фолликул</li><li>• яйца с зародышем/без зародыша</li></ul>                                                                                                               | 29                               | 2.59 ± 0.52                |

<sup>1</sup> по данным частичного секвенирования 28S рДНК; <sup>2</sup>G1 – вариант фрагмента последовательности 28S рДНК *S. spasskii* из рек Раздольная, Киевка, Карасик Приморский край, Россия; G2 – вариант фрагмента последовательности 28S рДНК *S. spasskii* от кефалей зал. Тонкин, Вьетнам; G3 – вариант фрагмента последовательности 28S рДНК *S. spasskii* из р. Киевка, Приморский край, Россия

Таблица 19. Метрические показатели ( $\mu\text{m}$ ) трематод рода *Parasaccocoelium*, использованные для корреляционного анализа. Для каждой пары видов в построении матрицы корреляции использована разница в значениях каждого показателя. Для анализа корреляций использован t-критерий Стьюдента (Халафян, 2008).  $r$  – значение индекса корреляции метрического признака и значений генетических дистанций для каждой пары видов (**жирным выделены статистически значимые корреляции**).

| Признак                  | Вид              |                          |                    |                   | $r$           |
|--------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|---------------|
|                          | <i>P. mugili</i> | <i>P. haematocheilum</i> | <i>P. polyovum</i> | <i>P. armatum</i> |               |
| Длина тела (среднее)     | 756              | 384                      | 979                | 909               | 0.1078        |
| Ширина тела (среднее)    | 309              | 199                      | 579                | 223               | -0.704        |
| Минимальная длина тела   | 616              | 308                      | 327                | 847               | -0.4961       |
| Максимальная длина тела  | 1116             | 466                      | 832                | 955               | -0.06549      |
| Минимальная ширина тела  | 224              | 158                      | 146                | 200               | -0.3722       |
| Максимальная ширина тела | 360              | 227                      | 262                | 246               | -0.0701       |
| Ротовая присоска (РП)    | 89×86            | 76×63                    | 59×59              | 70×75             | -0.0177       |
| Брюшная присоска (БП)    | 145×132          | 94×96                    | 70×73              | 87×89             | 0.152         |
| Длина БП / длина РП      | 1.63             | 1.24                     | 1.19               | 1.24              | 0.0045        |
| Ширина БП / Ширина РП    | 1.53             | 1.52                     | 1.24               | 1.19              | <b>0.9174</b> |
| Семенник                 | 153×122          | 99×84                    | 125×82             | 171×132           | -0.4999       |
| Яичник                   | 62×61            | 48×42                    | 36×39              | 64×57             | -0.3873       |

Таблица 20. Метрические показатели трематод рода *Skrjabinolecithum*, использованные для корреляционного анализа. Для каждой пары видов в построении матрицы корреляции использована разница в значениях каждого показателя. Для анализа корреляций использован t-критерий Стьюдента (Халафян, 2008);  $r$  – значение индекса корреляции метрического признака и значений генетических дистанций для каждой пары видов (**жирным выделены статистически значимые корреляции**).

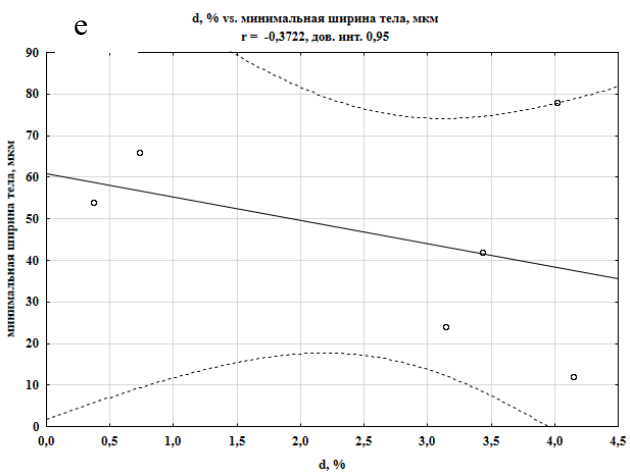
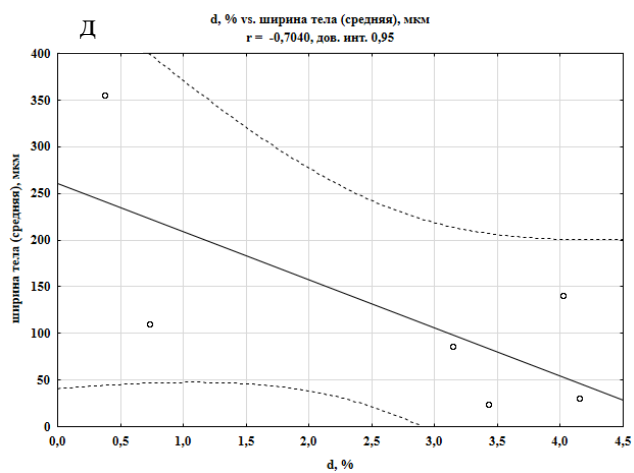
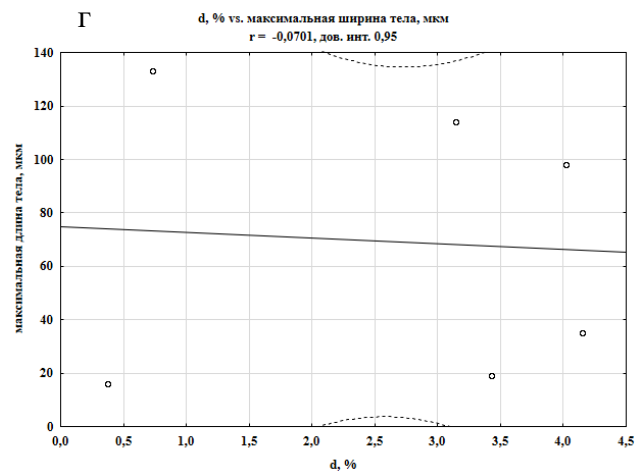
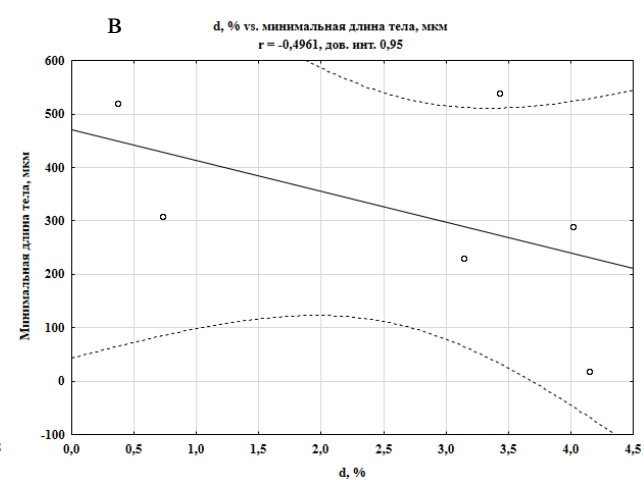
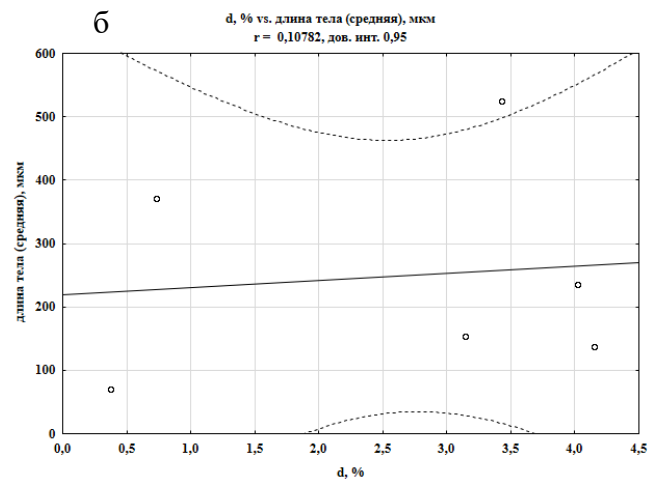
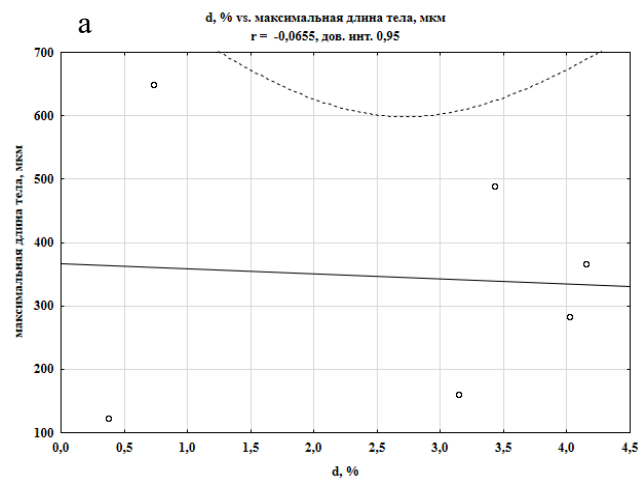
| Признак                  | <i>S. spasskii</i><br>GI | <i>S. pyriforme</i> | <i>S. spinosum</i> | <i>S. spasskii</i> GII | <i>S. spasskii</i><br>GIII | $r$           |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|---------------|
| Длина тела (среднее)     | 1086                     | 979                 | 1019               | 980                    | 1020                       | <b>0.8282</b> |
| Ширина тела (среднее)    | 316                      | 579                 | 370                | 334                    | 352                        | 0.1926        |
| Минимальная длина тела   | 393                      | 878                 | 801                | 801                    | 924                        | -0.1943       |
| Максимальная длина тела  | 1510                     | 1090                | 1294               | 1124                   | 1109                       | -0.1758       |
| Минимальная ширина тела  | 292                      | 493                 | 323                | 219                    | 308                        | 0.1847        |
| Максимальная ширина тела | 430                      | 755                 | 462                | 354                    | 400                        | 0.1250        |
| Ротовая присоска (РП)    | 85×100                   | 149×149             | 119×130            | 106×111                | 88×99                      | 0.183         |
| Брюшная присоска (БП)    | 117×118                  | 151×175             | 119×134            | 114×115                | 114×123                    | 0.0204        |
| Длина БП / длина РП      | 1.376                    | 1.013               | 1                  | 1.075                  | 1.295                      | 0.1482        |
| Ширина БП / Ширина РП    | 1.180                    | 1.174               | 1.031              | 1.036                  | 1.242                      | -0.3509       |
| Семенник                 | 165×164                  | 206×195             | 221×164            | 116×132                | 135×145                    | <b>0.7028</b> |
| Яичник                   | 78×59                    | 85×108              | 91×95              | 67×57                  | 54×64                      | <b>0.6875</b> |
| Фаринкс                  | 58×65                    | 158×155             | 89×109             | 59×77                  | 62×61                      | 0.2177        |

Таблица 21. Корреляции между морфологическими и молекулярными признаками для трематод рода *Parasaccocoelium*. Для анализа корреляций использован t-критерий Стьюдента (Халафян, 2008)

| № | Переменная                     | Корреляции (Отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,01000$ ) |            |       |              |              |
|---|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|-------|--------------|--------------|
|   |                                | Средние                                                             | Стд. откл. | 1     | 2            | 3            |
| 1 | Морфологические признаки       | 6.333                                                               | 1.033      | 1.000 | 0.249        | 0.344        |
| 2 | Фиксированные замены, 28S рДНК | 25.500                                                              | 15.579     | 0.249 | 1.000        | <b>0.976</b> |
| 3 | р-дистанции, 28S рДНК          | 2.640                                                               | 1.665      | 0.344 | <b>0.976</b> | 1.000        |

Таблица 22. Корреляции между морфологическими и молекулярными признаками для трематод рода *Skrjabinoecithum*. Для анализа корреляций использован t-критерий Стьюдента (Халафян, 2008)

| № | Переменная                     | Корреляции (Отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,01000$ ) |           |       |              |              |
|---|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|-------|--------------|--------------|
|   |                                | Средние                                                             | Стд.откл. | 1     | 2            | 3            |
| 1 | Морфологические признаки       | 1.333                                                               | 1.966     | 1.000 | 0.519        | 0.481        |
| 2 | Фиксированные замены, 28S рДНК | 6.000                                                               | 5.292     | 0.519 | 1.000        | <b>0.996</b> |
| 3 | р-дистанции, 28S рДНК          | 0.517                                                               | 0.399     | 0.481 | <b>0.996</b> | 1.000        |



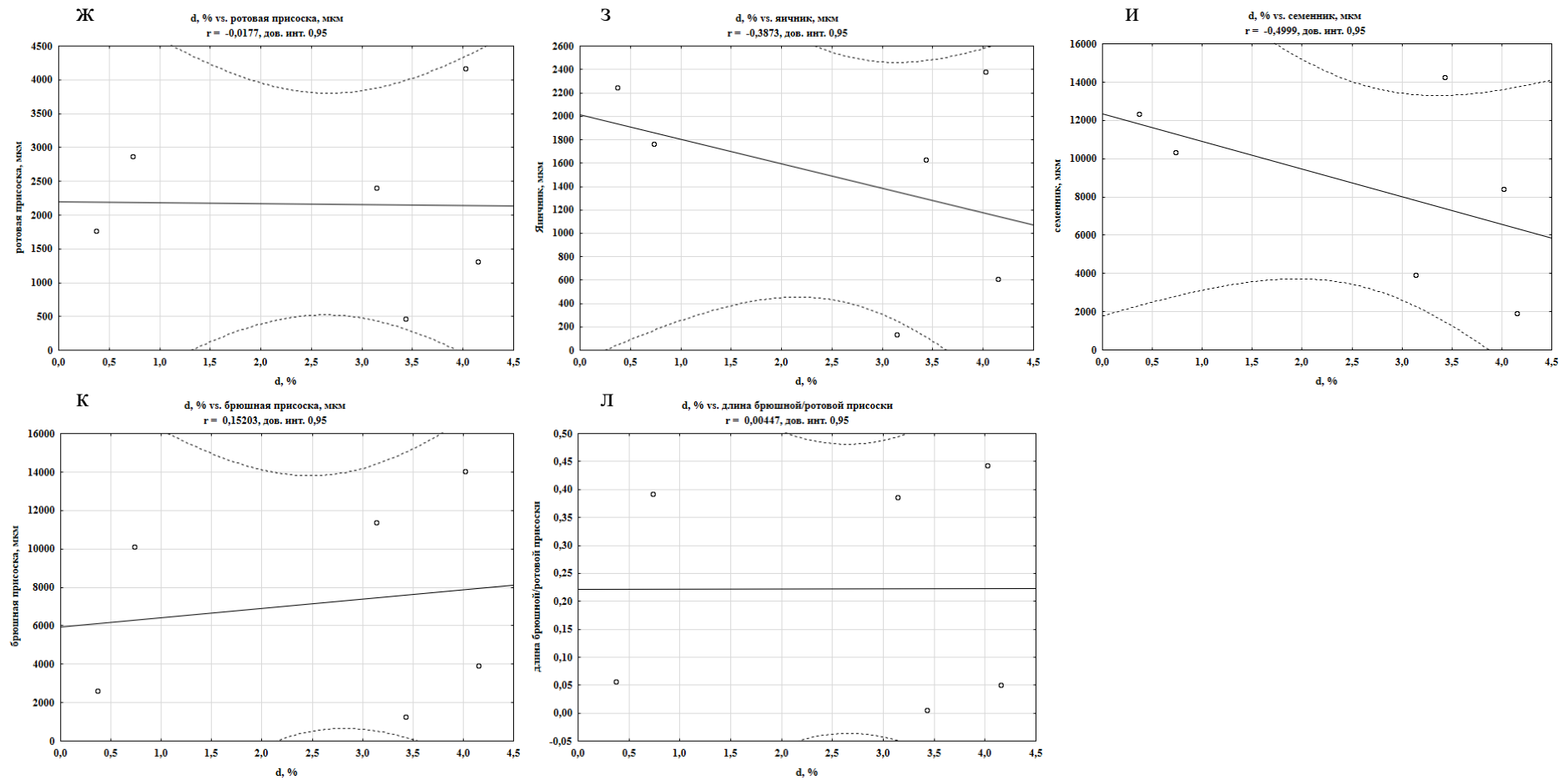


Рисунок 18. Диаграммы рассеяния и график корреляции в каждой паре видов трематод *Parasaccocoelium* между значениями генетических дистанций ( $d$ , %) и: а - максимальной длины тела, б - средней длиной тела, в - минимальной длиной тела, г - максимальной шириной тела, д - средней шириной тела, е - минимальной шириной тела, ж - размерами ротовой присоски, з - размерами яичника, и - размерами семенника, к - брюшной присоской, л - соотношением длины ротовой и брюшной присосок

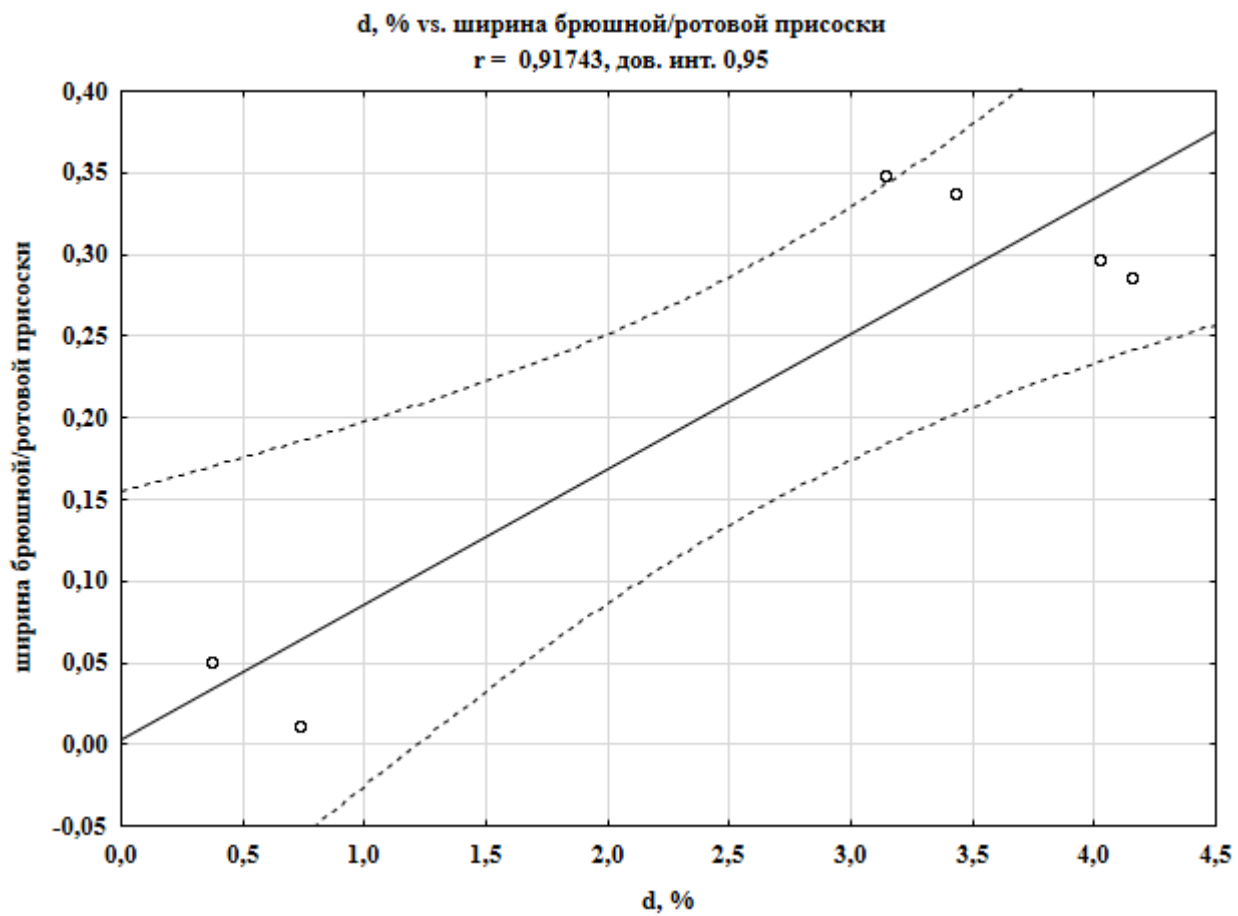
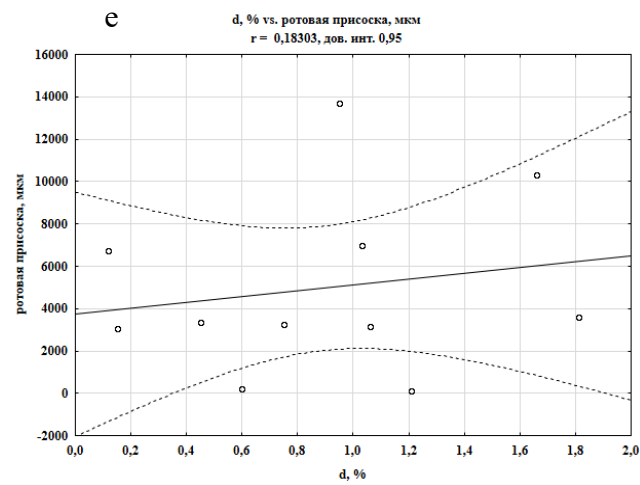
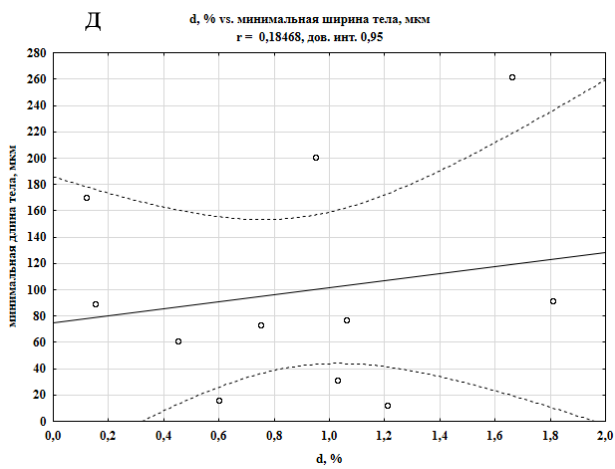
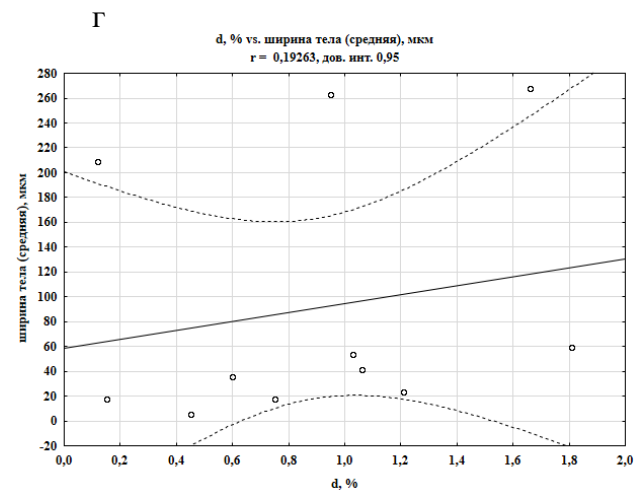
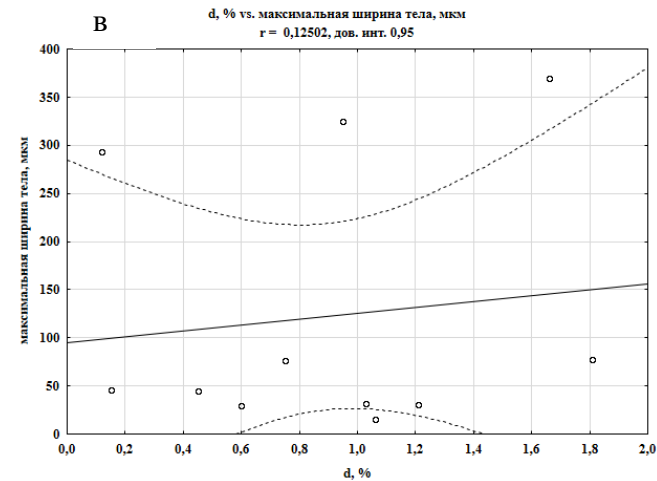
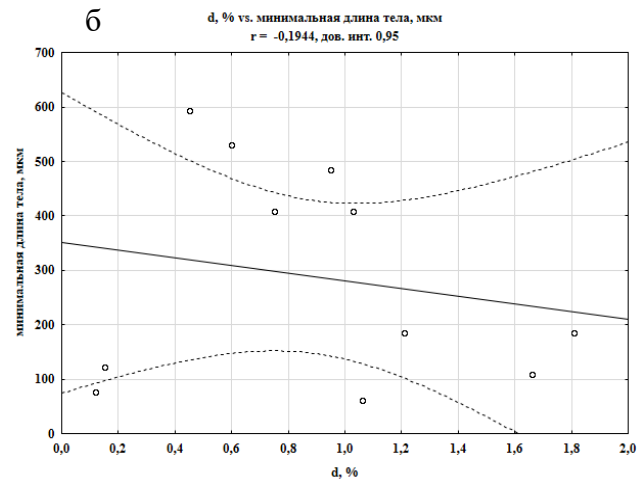
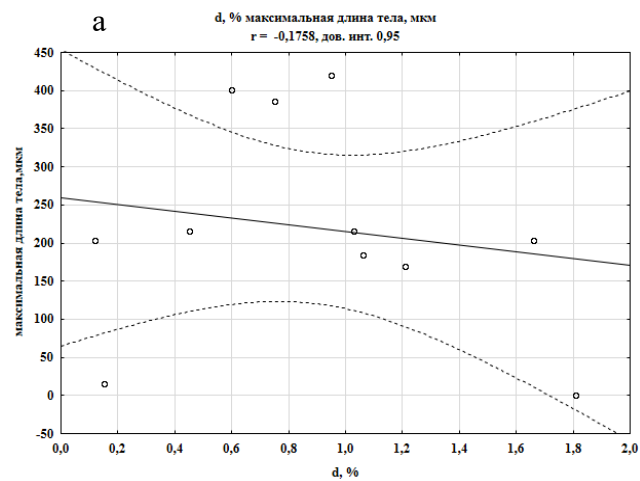


Рисунок 19. Диаграмма рассеяния и график корреляции между значениями генетических дистанций (d, %) и соотношением ширины брюшной и ротовой присосок в каждой паре видов трематод *Parasaccocoelium*.



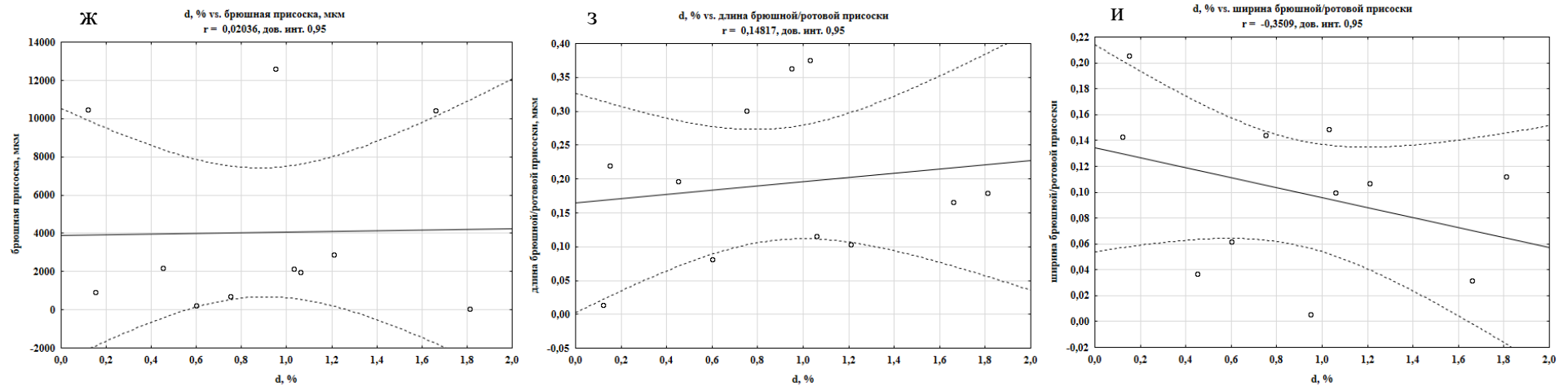


Рисунок 20. Диаграммы рассеяния и график корреляции в каждой паре видов трематод *Skrjabinolecithum* между значениями генетических дистанций ( $d$ , %) и: а - максимальной длины тела, б - минимальной длиной тела, в - максимальной шириной тела, г - средней шириной тела, д - и минимальной шириной тела, е - размерами ротовой присоски, ж - размерами брюшной присоски, з - соотношением длины ротовой и брюшной присосок, и - соотношением ширины ротовой и брюшной присосок.

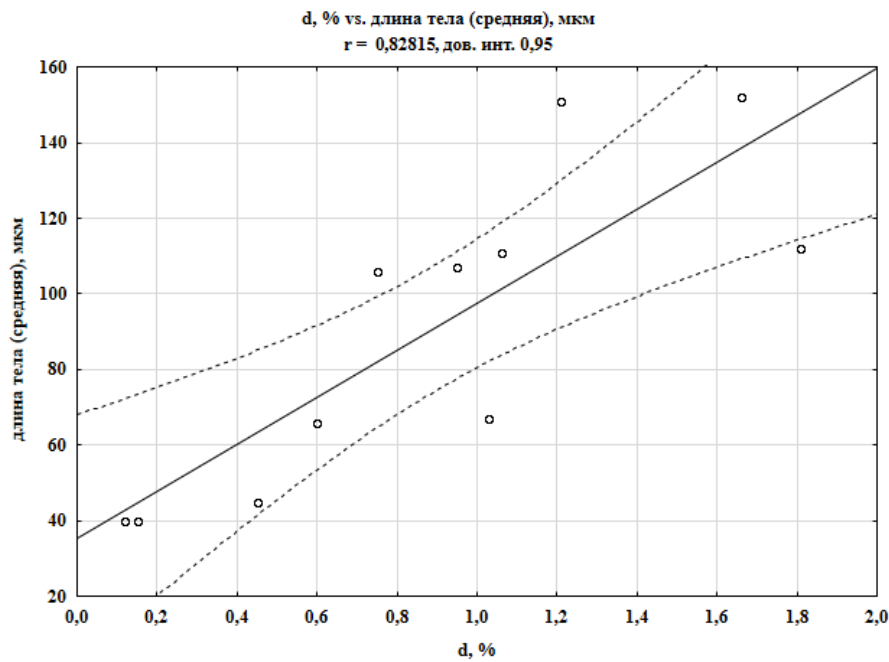


Рисунок 21. Диаграмма рассеяния и график корреляции между значениями генетических дистанций (d, %) и средней длиной тела в каждой паре видов трематод *Skrjabinolecithum*.

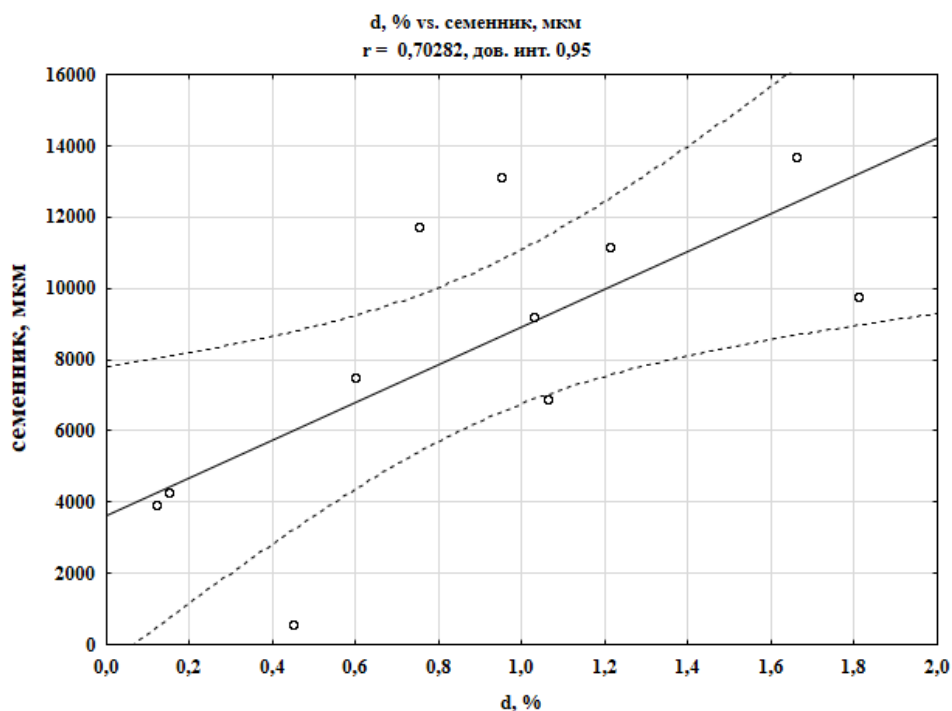


Рисунок 22. Диаграмма рассеяния и график корреляции между значениями генетических дистанций (d, %) и размерами семенника в каждой паре видов трематод *Skrjabinolecithum*.

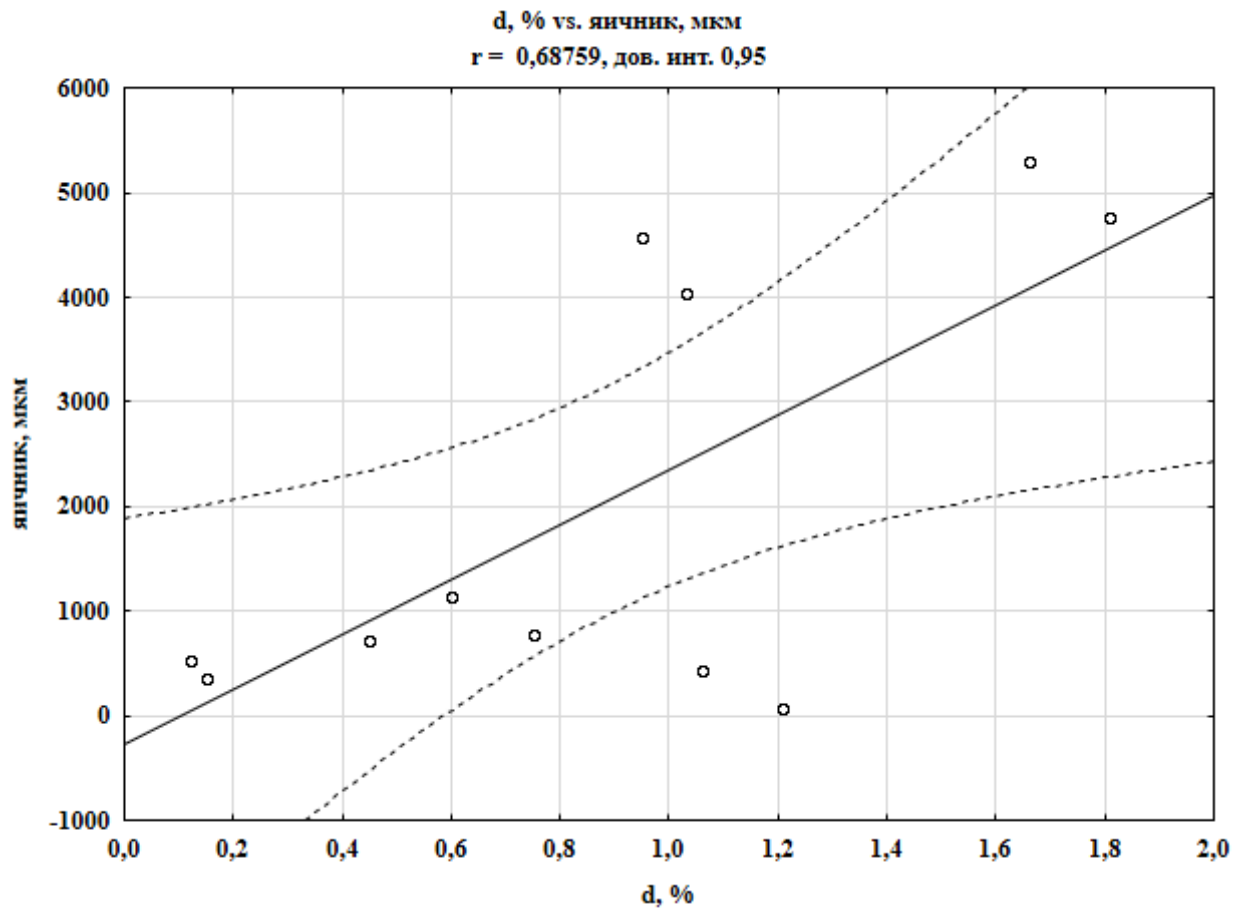


Рисунок 23. Диаграмма рассеяния и график корреляции между значениями генетических дистанций (d, %) и размерами яичника в каждой паре видов трематод *Skrjabinolecithum*.

### 3.5. Внутренние филогенетические связи Harpororidae на основании молекулярных данных

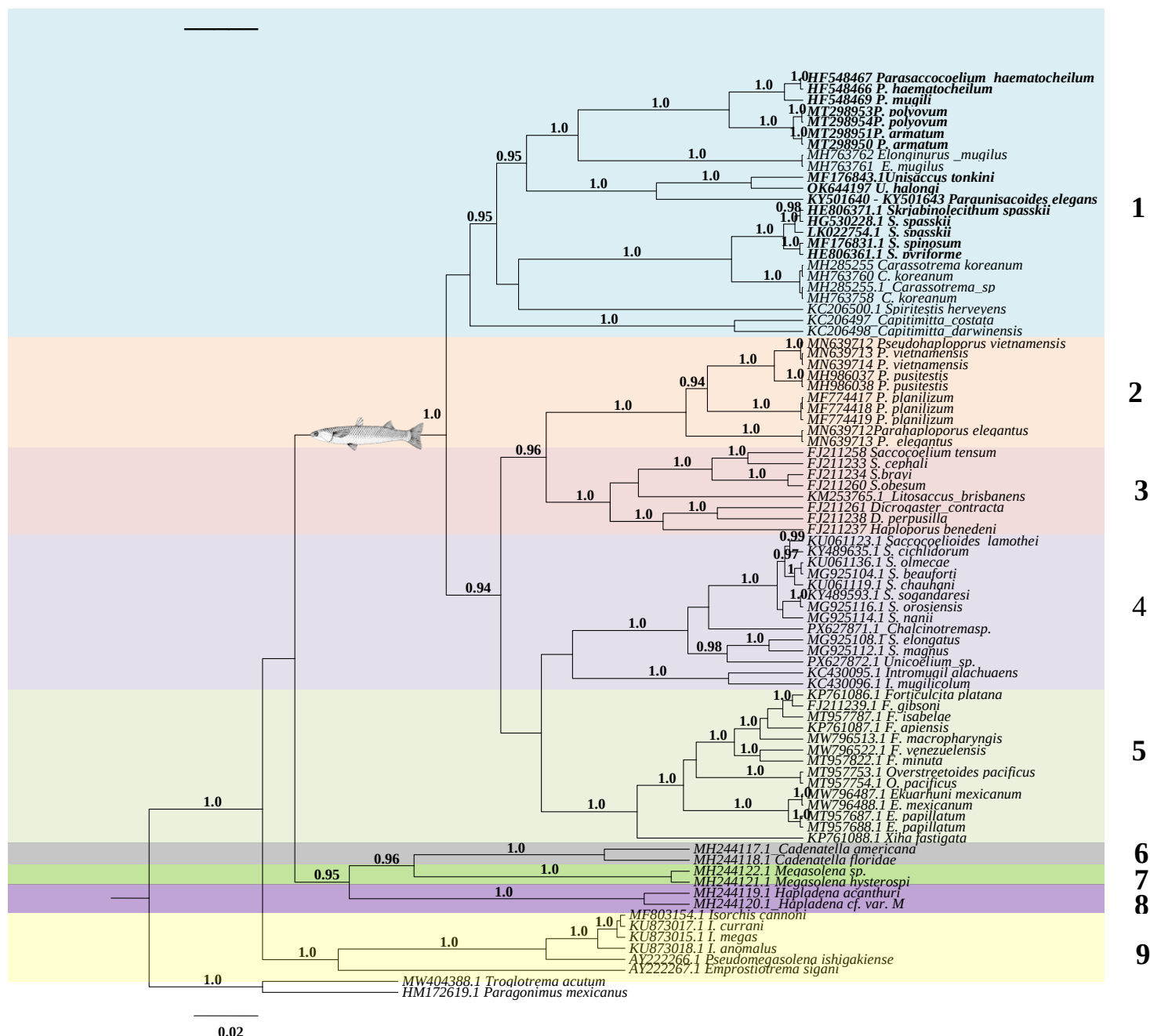


Рисунок 24. Филогенетические связи внутри Harpororoidea, реконструированные с помощью алгоритма Байеса на основании данных секвенирования последовательностей фрагмента гена 28S рРНК. Числа в узлах - апостериорные вероятности, указывающие на статистическую поддержку филогенетических связей (представлены только значимые) 1 - Waretrematinae, 2 – Pseudohaploporinae, 3 - Harpororinae, 4 - Chalcinotrematinae, 5 - Forticulcitinae, 6 - Cadenatellinae, 7 - Megasoleninae, 8 - Hapladeninae, 9 – Emprostiotrematidae.

В соответствии с целью работы и поставленными задачами были проанализированы морфологические признаки и результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей рибосомной ДНК для трематод родов *Parasaccocoelium*, *Skrjabinolectithum*, *Unisaccus* и *Paraunisaccoides* от кефалевых рыб юга Дальнего Востока России и Вьетнама, а также единичная последовательность 28S рДНК для *Carassotrema koreanum* от серебряного карася из Вьетнама. Полученные данные секвенирования фрагмента гена 28S рРНК были включены в общую выборку всех доступных нуклеотидных последовательностей этого гена для представителей Harpororidae. Эти данные легли в основу филогенетического анализа внутри Harpororidae, результаты которого приведены ниже.

Результаты филогенетического анализа показали, что гаплопорида являются монофилетическим семейством, представители которого подразделяется на несколько клад в соответствии с их принадлежностью к тому или иному подсемейству (Рисунок 24). Базальная группа внутри Harpororidae представлена кладой, объединяющей подсемейства Harpladeninae, Megasoleninae и Cadenatellinae – трематоды морских тропических видов рыб. Представители остальных подсемейств – паразиты кефалевых рыб, объединены в общую, высоко поддержанную группу. Внутри этой группы базальной оказалась клада, содержащая представителей подсемейства Waretrematinae. Структура данной клады четко отражает родовую дифференциацию трематод, а также показывает взаимоотношения родов внутри подсем. Waretrematinae. Так, сестринскими по отношению друг к другу оказались рода *Unisaccus* и *Paraunisaccoides*, *Paracaccocoelium* и *Elonginurus*, *Skrjabinolectithum* и *Carassotrema*. Род *Spiritestis* оказался сестринским по отношению к *Skrjabinolectithum* и *Carassotrema*, однако статистической поддержки эта связь не получила. Род *Capitimitta* представляет собой отдельную филогенетическую линию, базальную по отношению к остальным Waretrematinae; статистическая поддержка также была низкой. В целом подсемейство Waretrematinae по молекулярным характеристикам наиболее гетерогенно по сравнению с остальными подсемействами трематод,

инфицирующих кефалевых рыб. Низкая поддержка базального узла говорит о том, что взаимоотношения трематод, включенных в разные клады внутри *Waretrematinae* окончательно не ясны.

Представители остальных подсемейств внутри рассматриваемой группы кефалевых гаплопорид формировали высоко поддержанные клады. Сестринскими по отношению друг к другу оказались подсемейства *Harpororidae* и *Pseudoharpororidae*, образуя единую высокоподдержанную кладу. Подсемейства *Chalcinotrematinae* и *Forticulcitinae* также оказались тесно связаны друг с другом, но статистическая поддержка этой связи оказалась низкой, равно как и клады *Chalcinotrematinae*. Подсемейство *Forticulcitinae* в свою очередь характеризовалось статистически поддержанной монофилетичностью. Таким образом, результаты филогенетического анализа показали четкую структуризацию трематод семейства *Harpororidae* в соответствии с выделяемыми подсемействами, каждое из которых формировало собственную кладу. Также наши результаты показали четкую внутреннюю структуру подсемейства *Waretrematinae*, отражающую молекулярную дифференциацию и определенные взаимоотношения представителей его отдельных родов. Тем не менее, низкая поддержка базального узла говорит о том, что взаимоотношения трематод, включенных в разные клады внутри *Waretrematinae* окончательно не ясны.

Результаты филогенетического анализа, полученные в настоящей работе, подтверждают валидность подсемейства *Waretrematinae*. Все виды трематод, рассматриваемые по морфологическим данным в составе этого подсемейства (Overstreet, Curran, 2005), объединены в монофилетическую кладу. С другой стороны, филогенетические реконструкции показывают, что трематоды кефалевых рыб из разных подсемейств *Harpororidae*, присутствующих на филогенетическом древе в виде высоко поддержанных клад, в основном приурочены к определённым географическим областям. Так, например, трематоды подсемейства *Waretrematinae*, включая виды, обоснованные и проанализированные в нашей работе, представлены от кефалевых рыб Индо-Западной Пацифики (Рисунок 22) (Pulis, Overstreet, 2013; Andres et al., 2014),

также как и черви подсемейства Pseudohaploporinae (Atopkin et al., 2019; 2020). Трематоды подсемейства Haploporinae, включенные в анализ, в основном от кефалей бассейна Средиземного моря (Blasco-Costa et al., 2009; 2010) за исключением трематод рода *Litosaccus*, описанных от лобана *Mugil cephalus* из реки Брисбен, Австралия (Andres et al., 2014). Представители Forticulcitinae и Chalcinotrematinae – в основном от кефалевых рыб Атлантики, включая Евразийское, Североамериканское и Южноамериканское побережья (Pulis et al., 2013; Andres et al., 2015; Andrade-Gómez et al., 2017; 2019; Andrade-Gómez, García-Valera, 2021). Эти результаты согласуются с мнением, высказанным ранее Overstreet & Curran (2005) относительно распространения разных представителей гаплопорид по разным географическим областям. Однако следует учитывать ограниченный объем материала, использованный для реконструкции филогенетических связей, а новые молекулярные данные по другим видам Haploporidae могут привести к другим вариантам интерпретации филогенетических связей гаплопорид или к очередным таксономическим ревизиям.

Что касается трематод подсемейства Waretrematinae, то результаты морфологического и филогенетического анализов, выполненных в рамках настоящей работы, показали, что представители родов *Parasaccocoelium* и *Skrjabinoecithum* встречаются как на территории юга Дальнего Востока России, так и во Вьетнаме. Интересно, что эти два рода, несмотря на наличие среди них симпатрических видов на территории юга Дальнего Востока России, не являются сестринскими группами по отношению друг к другу, а формируют близкие филогенетические связи с разными представителями Waretrematinae. Так, например, виды рода *Parasaccocoelium*, зарегистрированные в основном в Приморье, наиболее близко связаны с трематодами *Elonginurus mugilis*, которые в настоящее время известны только для кефалевых рыб Вьетнама. При этом единственный представитель рода *Parasaccocoelium* - типовой вид, *P. mugili*, обнаружен в кефалевых рыбах как юга Дальнего Востока России, так и Вьетнама (Besprozvannykh et al., 2015). Это означает, что ныне существующие трематоды

*Elonginurus* и *Parasaccocoelium* в эволюционном прошлом, имели общую ближайшую предковую форму, представители которой, видимо, были распространены вдоль восточного побережья Евразии, охватывая как минимум территорию от юга Дальнего Востока России до Вьетнама. На филогенетическом древе, реконструированном по данным частичного секвенирования гена 28S рРНК, виды рода *Parasaccocoelium* образовали монофилетическую кладу, сестринскую по отношению к *Elonginurus mugilis* и разделились на две высоко поддерживаемые группы. В первую группу вошли исключительно дальневосточные виды *Parasaccocoelium polyovum* и *P. armatum*, во вторую – типовой вид *P. mugili*, отмеченный как в Приморье, так и во Вьетнаме (Besprozvannykh et al., 2015), и дальневосточный вид *P. haematocheilum*. Такая структура клады указывает на существование в прошлом общей предковой формы для видов *Parasaccocoelium*, также распространенной как минимум от Вьетнама до юга Дальнего Востока России. При этом, на основании положения узлов клады [*Elonginurus* / *Parasaccocoelium*] и клады *Parasaccocoelium* относительно друг друга можно заключить, что эволюционный возраст предковой формы представителей обоих родов как минимум в два раза превышает таковой для гипотетической предковой формы трематод *Parasaccocoelium*. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что фауна трематод *Parasaccocoelium*, известная в настоящее время для кефалевых рыб юга Дальнего Востока России, имеет тропическое южно-тихоокеанское происхождение, связанное с глубокой дифференциацией предковой формы представителей этого рода и трематод *Elonginurus mugilis*. Косвенным подтверждением тропического происхождения трематод *Parasaccocoelium* российского Дальнего Востока служат особенности жизненного цикла гаплопорид, в который вовлечены солоноватоводные брюхоногие моллюски тропического рода *Stenothyra* Benson, 1856, ареал которого охватывает Восточную и Австралийскую области, Японию и Приморье (Лихарев, 1953).

Результаты филогенетического анализа также показали, что трематоды родов *Skrjabinolecithum* и *Carassotrema* представляют собой сестринские группы.

Это результат, по нашему мнению, подтверждает гипотезу Мантера, согласно которой кефалевые рыбы послужили своеобразным «экологическим мостом» для перехода трематод Harporidae с морских рыб на пресноводную ихтиофауну (Manter, 1957). Overstreet и Curran (2005) предположили, что трематоды *Carassotrema* происходят от предковых форм Waretrematinae, паразитов эстуарных кефалевых рыб. Атопкин с соавт. (2019), на основании молекулярных данных впервые продемонстрировали филогенетическую близость представителей двух родов: *Skrjabinolecithum*, охарактеризованного нами по комплексным данным (Атопкин с соавт., 2015a; 2015b), и *Carassotrema*, выявленного впервые в России от карасей *Carassius gibelio* в цитируемой работе (Atopkin et al., 2019). Авторы данного исследования высказали мнение, что эти результаты можно объяснить с позиций гипотезы «экологического моста» (Manter, 1957). Филогенетические реконструкции, полученные в нашей работе на основании частичного секвенирования гена 28S рРНК с привлечением новых молекулярных данных для *C. koreanum* от карасей Вьетнама, а также трех новых видов рода *Skrjabinolecithum* (Рисунок 25) полностью повторяют результаты Атопкина с соавт. (2019). Нахождение видов *Carassotrema* и *Skrjabinolecithum* как на юге Дальнего Востока России, так и во Вьетнаме (в пределах одних родовых групп) свидетельствует о том, что процесс перехода гаплопорид с эстуарной ихтиофауны на пресноводную с последующей видовой дифференциацией происходил не локально, а на довольно обширной территории. Для большинства представителей «кефалевых гаплопорид» в качестве окончательного хозяина часто фигурирует лобан - *Mugil cephalus*, что, вероятно, связано с его обширным ареалом (Индо-Западная и Южная Пацифика, Атлантика, Средиземноморье) (da Silva, 1980). В силу особенностей распространения, скорее всего именно этот вид сыграл для гаплопорид ключевую роль в замене морской ихтиофауны на пресноводную.

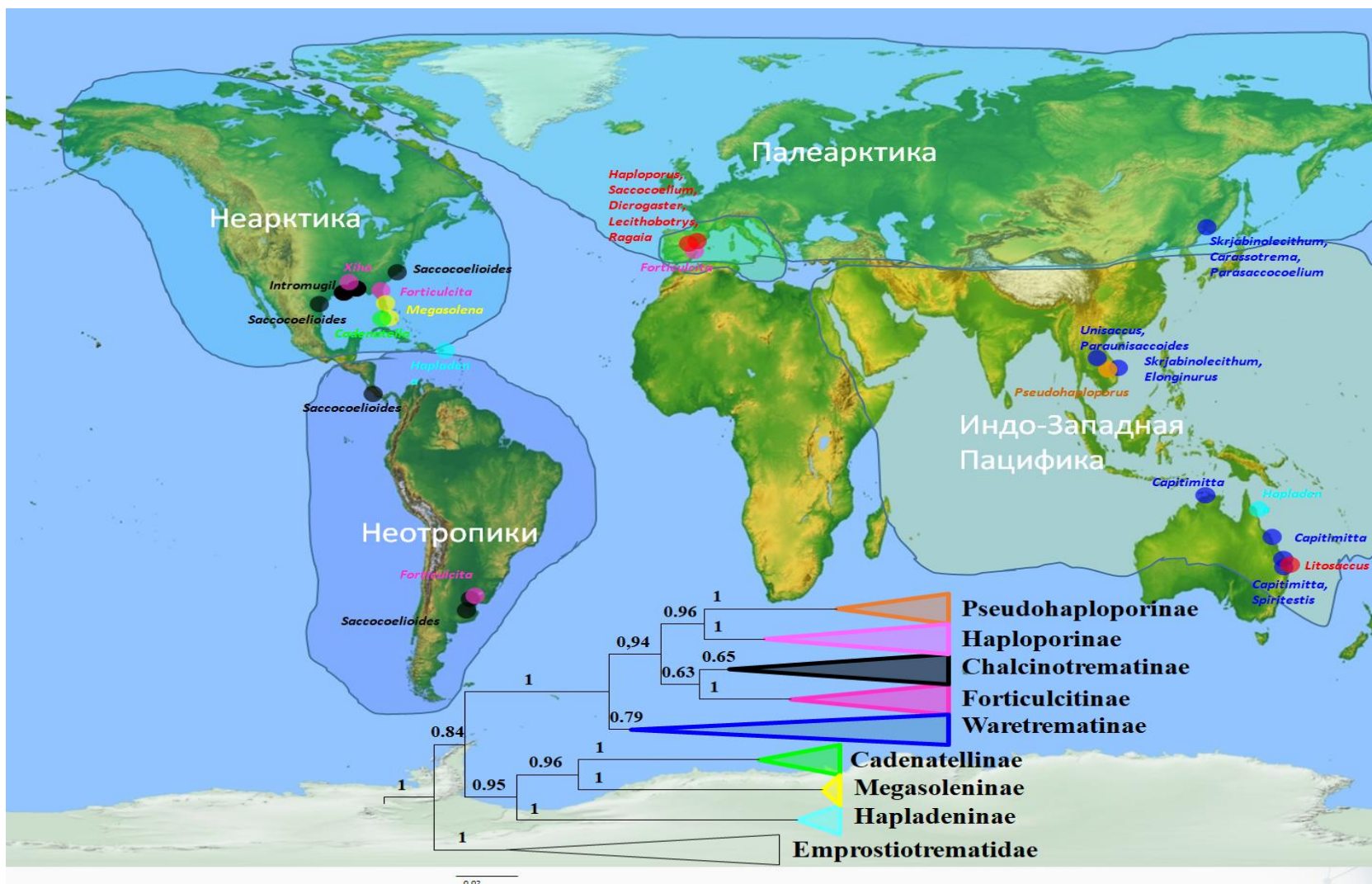


Рисунок 25. Места регистрации представителей разных подсемейств Haplororidae по доступным молекулярным данным

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К началу исследования с Дальнего Востока России для подсемейства Waretrematinae было известно 2 вида из двух родов и из Вьетнама – 2 вида одного рода. Суммируя все морфологические и молекулярные данные, полученные нами и другими авторами (Blasco-Costa et al., 2009, 2010; Pulis, Overstreet, 2013; Andres et al., 2014, 2015; Атопкин и др. 2015a, 2015b; Andrade-Gómez et al., 2017; Atopkin et al., 2019; Andrade-Gómez et al., 2019; Atopkin et al., 2019, 2020; Andrade-Gómez García-Valera, 2021), а так же применяя комплексный подход к изучению таксономии и систематики гаплопорид в пределах подсемейства Waretrematinae нами восстановлен род *Parasaccocoelium*, выполнено переописание рода *Skrjbinolecithum* и подтверждена валидность типового вида *Skrjbinolecithum spasskii*, а также описано семь новых для науки видов трематод Harpororidae от кефалевых рыб Российского Дальнего Востока и Вьетнама. В результате проведенного исследования, на Дальнем Востоке России зарегистрировано 6 видов из 2 родов, а во Вьетнаме – 4 вида из 3 родов трематод. Всего описано 7 новых видов трематод, относящихся к подсемейству Waretrematinae: *Skrjabinolecithum spinosum* Besprozvannykh, Atopkin, Ngo, Ha, Tang, Beloded, 2017, *S. pyriforme* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko, Beloded, 2017, *Parasaccocoelium polyovum* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko, Nikitenko, 2014, *P. haematocheilum* Besprozvannykh, Atopkin, Ermolenko, Nikitenko, 2014, *Unisaccus halongi* Atopkin, Besprozvannykh, Beloded, Ha, Nguyen, Nguyen, 2022, *U. tonkini* Besprozvannykh, Atopkin, Ngo, Ha, Tang, Beloded, 2017, *Paraunisaccoides elegans* Atopkin, Besprozvannykh, Beloded, Ha, Nguyen, Nguyen, 2022.

Изучение филогении внутри Harpororidae на основании молекулярных данных позволило выявить ряд ключевых взаимосвязей между отдельными родами гаплопорид, подтверждающих существование эволюционных переходов этих трематод (или их предковых форм) между рыбами из солоноватых и пресных водоемов. Наряду с этим анализ филогенетических связей позволяет выдвинуть гипотезу о тропическом происхождении «кефалевых гаплопорид». На это

указывают близкие филогенетические связи средиземноморских трематод Haplororinae и вьетнамских Pseudohaplororinae, а также связи между отдельными родами, включающими вьетнамских и российских дальневосточных видов трематод внутри Waretrematinae: (*Parasaccocoelium/Elonginurus*) и (*Skrjabinolecithum/Carassotrema*). Прибрежная акватория Индийского океана характеризуется высоким видовым разнообразием кефалевых рыб и гаплопориid, однако для паразитов приводятся только морфологические данные. Между тем, применение комплексного морфологического и молекулярного подхода к изучению трематод с этих территорий значительно расширит представления о таксономическом разнообразии Haplororidae, а также позволит получить новые данные для подтверждения или опровержения выдвинутой в настоящей работе гипотезы тропического происхождения «кефалевых гаплопориid».

Таким образом, по результатам проведенных исследований, можно сделать следующие выводы:

1. Фауна трематод из подсемейства Waretrematinae семейства Haplororidae, паразитирующих на кефалевых рыбах, на Дальнем Востоке России дополнена 4 видами, а фауна Вьетнама - тремя видами сосальщиков. Комплексное использование морфологических и молекулярных методов позволило описать 7 новых для науки видов Waretrematinae.
2. На основании проведенных исследований восстановлен таксономический статус рода *Parasaccocoelium*, ранее сведенного в синонимы к роду *Paraunisaccoides*. Наряду с типовым видом в состав первого включены два новых вида *Parasaccocoelium hametochelium* и *P. polyovum*, а второго – *Paraunisaccoides elegans*. Самостоятельность этих видов обоснована нами на основании морфологических и молекулярных данных.
3. Впервые показано, что представители рода *Unisaccus*, причисляемые ранее к Haplororinae, принадлежат подсемейству Waretrematinae. В роде *Unisaccus* описаны два новых вида *U. tonkini* и *U. halongi* из Вьетнама.
4. На территории юга ДВ России описаны два новых вида рода *Skrjabinolecithum*: *S. pyriforme* и *S. spinosum*. Выявлены новые

морфологические особенности типового вида этого рода *S. spasskii* – паразита кефалей ДВ России, впервые обнаруженного нами во Вьетнаме. На основании молекулярных данных установлено, что трематоды *S. spasskii* из разных локаций юга ДВ России и Вьетнама обладают специфическими вариантами последовательностей рибосомной ДНК (рДНК) и претендуют на статус отдельных видов.

5. На основании результатов анализа частичных нуклеотидных последовательностей гена 28S рРНК установлено, что видовые и родовые молекулярные характеристики в пределах Harpororidae в основном неоднородны и не могут быть сведены к строгим границам значений показателей для четкой дифференциации групп разных таксономических рангов.
6. Результаты корреляционного анализа указывают на согласованность между молекулярной дифференциацией видов трематод и их различиями по некоторым индивидуальным морфометрическим показателям внутри родов *Parasaccocoelium* и *Skrjabinolecithum*; выявленные статистически значимые корреляции между морфометрическими и молекулярными показателями представляют исключительно индивидуальный для каждого рода случай согласованности.
7. Фауна трематод *Parasaccocoelium*, известная в настоящее время для кефалевых рыб юга Дальнего Востока России, имеет тропическое южно-тихоокеанское происхождение, связанное с глубокой дифференциацией предковой формы представителей этого рода и трематод *Elonginurus mugilis*.
8. Результаты филогенетического анализа Waretrematinae указывают на обоснованность гипотезы о роли кефалевых рыб в качестве «экологического моста», для перехода трематод Harpororidae с морских рыб на пресноводную ихтиофауну.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атопкин Д.М., Белодед (Никитенко) А.Ю., Нго Х.Д., Ха Н.В., Танг Н.В. Молекулярно-генетическая характеристика дальневосточной трематоды *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 (Digenea, Harpororidae) — паразита кефалевых рыб // Молекулярная биология. 2015. Том 49, № 3. С. 422–429.
2. Белоус Е.В. К систематике трематод семейства Harpororidae Nicoll // Труды Гельминтологической лаборатории. Академия наук СССР. 1954. Том 7. С. 277–281.
3. Беспрозванных В.В., Атопкин Д.М., Нго Х.Д., Белодед А.Ю., Ермоленко А.В., Ха Н.В., Танг Н.В. Трематода *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 (Digenea: Harpororidae), паразит кефалей (Mugilidae) из залива Петра Великого Японского моря и из вьетнамских вод Тонкинского залива: морфология и молекулярные данные // Биология моря. 2015. Том 41, № 4. С. 256–263.
4. Лихарев И.М. Особенности распространения моллюсков Приморского края // Труды Зоологического института Академии наук СССР. 1953. С. 277–288.
5. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. Москва: Государственное издательство «Советская наука», 1957. 466 с.
6. Скрыбин К.И. Трематоды животных и человека. Основы трематодологии. Москва: Изд-во Академии наук СССР, 1947. Том 1.
7. Скрыбин К.И. Трематоды животных и человека. Основы трематодологии. Москва: Изд-во Академии наук СССР, 1956. Том 12. 933 с.
8. Халафян А.А. Statistica 6: статистический анализ данных : учебное пособие. Москва: Бином-Пресс, 2008. 512 с. ISBN 978-5-9518-0215-6.
9. Statistica.ru [Электронный ресурс]. URL: <http://statistica.ru>.
10. Ahmad J. On seven new digenetic trematodes of marine fishes from the Arabian Sea, off the Panjim coast, Goa // Pakistan Journal of Zoology. 1987. Vol. 19, No. 4. P. 321–340.

11. Andrade-Gómez L., Sereno-Uribe A.L., García-Varela M. Description of a new species and understanding the genetic diversity of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Haploporidae) in Middle America using mitochondrial and nuclear DNA sequences // *Parasitology International*. 2019. Vol. 71. P. 87–98.
12. Andrade-Gómez L., Pinacho-Pinacho C.D., Hernández-Orts J.S., Sereno-Uribe A.L., García-Varela M. Morphological and molecular analyses of a new species of *Saccocoelioides* Szidat, 1954 (Haploporidae Nicoll, 1914) in the fat sleeper *Dormitator maculatus* (Bloch) (Perciformes: Eleotridae) from the Gulf of Mexico // *Journal of Helminthology*. 2017. Vol. 91. P. 504–516.
13. Andrade-Gómez L., García-Varela M. Unexpected morphological and molecular diversity of trematode (Haploporidae: Forticulcitinae) parasites of mullets from the ocean Pacific coasts in Middle America // *Parasitology Research*. 2021. Vol. 120, No. 1. P. 55–72.
14. Andres M.J., Curran S.S., Fayton T.J., Pulis E.E., Overstreet R.M. An additional genus and two additional species of Forticulcitinae (Digenea: Haploporidae) // *Folia Parasitologica*. 2015. Vol. 62. P. 25.
15. Andres M.J., Pulis E.E., Overstreet R.M. Description of three species of *Isorchis* (Digenea: Atractotrematidae) from Australia // *Acta Parasitologica*. 2016. Vol. 61. P. 590–601.
16. Andres M.J., Pulis E.E., Cribb T.H., Overstreet R.M. Erection of the haploporid genus *Litosaccus* n. g. and its phylogenetic relationship within the Haploporidae Nicoll, 1914 // *Systematic Parasitology*. 2014. Vol. 89. P. 185–194.
17. Andres M.J., Pulis E.E., Curran S.S., Overstreet R.M. On the systematics of some marine haploporids (Trematoda) with the description of a new species of *Megasolena* Linton, 1910 // *Parasitology International*. 2018. Vol. 67. P. 805–815.
18. Atopkin D.M., Besprozvannykh V.V., Ha D.N., Nguyen V.H., Nguyen V.T., Chalenko K.P. A new subfamily, Pseudohaploporinae subfam. n. (Digenea: Haploporidae), with morphometric and molecular analyses of two new species: *Pseudohaploporus vietnamensis* n. g., sp. n. and *Pseudohaploporus*

- planilizum* n. g., sp. n. from Vietnamese mullet // Parasitology International. 2019. Vol. 69. P. 17–24.
19. Atopkin D.M., Beloded (Nikitenko) A.Yu., Ngo H.D., Ha N.V., Tang N.V. Molecular genetic characterization of the far eastern trematode *Skrjabinoecithum spasskii* Belous, 1954 (Digenea, Haploporidae), a parasite of mullets // Molecular Biology. 2015. Vol. 49, No. 3. P. 373–379.
  20. Atopkin D.M., Besprozvannykh V.V., Ha D.N., Nguyen V.H., Nguyen V.T. New species of *Parasaccocoelium* (Haploporidae) and new genus *Pseudohaplospalchnus* (Haplospalchnidae) from mullet fish in the Far East of Russia and Vietnam: morphological and molecular data // Journal of Helminthology. 2020. Vol. 94, e154. P. 1–8.
  21. Atopkin D.M., Besprozvannykh V.V., Beloded A.Yu., Ha N.D., Nguyen H.V., Nguyen T.V. Restoration of the genus *Paraunisaccoides* Martin, 1973 (Digenea: Haploporidae) and description of *P. elegans* n. sp. and *Unisaccus halongi* n. sp. from mugilid fish in Vietnam // Diversity. 2022. Vol. 14, No. 8.
  22. Belous E.V. Contribution to the systematics of trematode family Haploporidae Nicoll, 1914 // Trudy Gel'mintologicheskoy Laboratorii. Akademiya Nauk SSSR. 1954. Vol. 7. P. 227–281.
  23. Besprozvannykh V.V., Atopkin D.M., Ngo H.D., Ermolenko A.V., Ha N.V., Tang N.V., Beloded A.Yu. Morphometric and molecular analyses of two digenean species from the mullet: *Haplospalchnus pachysomus* (Eysenhardt, 1892) from Vietnam and *Provitellotrema crenimugilis* Pan, 1984 from the Russian southern Far East // Journal of Helminthology. 2016. Vol. 90, No. 2. P. 238–244.
  24. Besprozvannykh V.V., Atopkin D.M., Ngo H.D., Ermolenko A.V., Van Ha N., Van Tang N., Beloded A.Y. Morphometric and molecular analyses of two digenean species in mugilid fish: *Lecithaster mugilis* Yamaguti, 1970 from Vietnam and *L. sudzuhensis* n. sp. from southern Russian Far East // Journal of Helminthology. 2017. Vol. 91, No. 3. P. 326–331.

25. Besprozvannykh V.V., Atopkin D.M., Ermolenko A.V., Nikitenko A.Yu. Restoration of the genus *Parasaccocoelium* Zhukov, 1971 (Digenea: Haploporidae) and a description of two new species from mugilid fish in the Far East of Russia // *Journal of Helminthology*. 2015. Vol. 89, No. 5. P. 565–576.
26. Besprozvannykh V.V., Atopkin D.M., Ngo H.D., Beloded A.Yu., Ermolenko A.V., Ha N.V., Tang N.V. The trematode *Skrjabinoлецithum 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 // *Russian Journal of Marine Biology*. 2015. Vol. 41, No. 4. P. 286–294.
27. 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.
28. Blasco-Costa I., Balbuena J.A., Kostadinova A., Olson P.D. Interrelationships of the Haploporinae (Digenea: Haploporidae): a molecular test of the taxonomic framework based on morphology // *Parasitology International*. 2009. Vol. 58, No. 3. P. 263.
29. Blasco-Costa I., Balbuena J.A., Raga J.A., Kostadinova A., Olson P.D. Molecules and morphology reveal cryptic variation among digeneans infecting sympatric mullets in the Mediterranean // *Parasitology*. 2010. Vol. 137. P. 287–302.
30. Briscoe A.G., Bray R.A., Brabec J., Littlewood D.T. The mitochondrial genome and ribosomal operon of *Brachycladium goliath* (Digenea: Brachycladiidae) recovered from a stranded minke whale // *Parasitology International*. 2016. Vol. 65, No. 3. P. 271–275.
31. Brooks D.R., Grady R.T., Glen D.R. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation // *Canadian Journal of Zoology*. 1985. Vol. 63. P. 411–443.

- 32.Ceccolini F., Cianferoni F. Nomenclature changes in the flatworms (Platyhelminthes) // Invertebrate Zoology. 2021. Vol. 18, No. 4. P. 451–456. doi: 10.15298/invertzool.18.4.02.
- 33.Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures // American Journal of Human Genetics. 1967. Vol. 19. P. 233–257.
- 34.Crandall K.A., Templeton A.R. Applications of intraspecific phylogenetics // New Uses for New Phylogenies. 1996. P. 81–100.
- 35.Cribb T.H., Pichelin S.P., Bray R.A. *Pholeohedra overstreeti* n. g., n. sp. (Digenea: Haploporidae) from *Girella zebra* (Kyphosidae) in South Australia // Systematic Parasitology. 1998. Vol. 39. P. 95–99.
- 36.Curran S.S., Tkach V.V., Overstreet R.M. A review of *Polylekithum* Arnold, 1934 and its familial affinities using morphological and molecular data, with description of *Polylekithum catahoulensis* sp. nov. // Acta Parasitologica. 2006. Vol. 51, No. 4. P. 238–248.
- 37.Curran S.S., Pulis E.E., Andres M.J., Overstreet R.M. Two new species of *Saccocoelioides* (Digenea: Haploporidae) with phylogenetic analysis of the family, including species of *Saccocoelioides* from North, Middle, and South America // Journal of Parasitology. 2018. Vol. 104, No. 3. P. 221–239.
- 38.De Silva S.S. Biology of juvenile grey mullet: a short review // Aquaculture. 1980. Vol. 19, No. 1. P. 21–36.
- 39.DeGroot Morris H. Optimal Statistical Decisions. New York: McGraw-Hill, 1970.
- 40.Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32, No. 5. P. 1792–1797.
- 41.Efron B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife // The Annals of Statistics. 1979. Vol. 7. P. 1–26.
- 42.Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // Journal of Molecular Evolution. 1981. Vol. 17. P. 368–376.
- 43.Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method // The American Naturalist. 1985. Vol. 125, No. 1. P. 1–15.

- 44.Fisher R.A. On the mathematical foundations of theoretical statistics // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1922. Vol. 1.
- 45.Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- 46.Holder M., Lewis P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches // Nature Reviews Genetics. 2003. Vol. 4.
- 47.Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology // Science. 2001. Vol. 294. P. 2310–2314.
- 48.Huston D.C., Cutmore S.C., Cribb T.H. *Trigonocephalotrema* (Digenea: Haplosporididae), a new genus for trematodes parasitising fishes of two Indo-West Pacific acanthurid genera // Invertebrate Systematics. 2018. Vol. 32. P. 759–773.
- 49.Jones A., Bray R.A., Gibson D.I. Keys to the Trematoda. London: CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005. Vol. 2.
- 50.Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16, No. 2. P. 111–120.
- 51.Kruskal J.B. On the Shortest Spanning Subtree of a Graph and the Traveling Salesman Problem // Proceedings of the American Mathematical Society. 1956. Vol. 7. P. 48–50.
- 52.Laplace P. Memoir on the Probability of the Causes of Events // Statistical Science. 1986. Vol. 1, No. 3. P. 359–378.
- 53.Larget B., Simon D.L. Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. 1999. Vol. 16. P. 750–759.

- 54.Liu S., Peng W., Gao P., Fu M., Lu M., Gao J., Xiao J. Digenean parasites of Chinese marine fishes: a list of species, hosts and geographical distribution // Systematic Parasitology. 2010. Vol. 75, No. 1. P. 1–52.
- 55.Liu S., Yang T. Two new species of *Pseudohapladena* Yamaguti, 1952 (Digenea: Waretrematidae) from mugilid fish from the Taiwan straits // Chinese Journal of Parasitology. 2002. Vol. 88. P. 358–361.
- 56.Lockyer A.E., Olson P.D., Littlewood D.T. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory // Biological Journal of the Linnean Society. 2003. Vol. 78. P. 155–171.
- 57.Luton K., Walker D., Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) // Molecular and Biochemical Parasitology. 1992. Vol. 56. P. 323–327.
- 58.Machida M. Digenean trematodes from mullets in Japanese and adjacent waters // Japanese Journal of Parasitology. 1996. Vol. 45. P. 125.
- 59.Madhavi R. Digenetic trematodes from marine fishes of Waltair coast, Bay of Bengal, Families Haplosporididae and Haploporidae // Rivista di Parassitologia. 1979. Vol. 40. P. 237–248.
- 60.Manter H.W. Host specificity and other host relationships among the digenetic trematodes of marine fishes // Proceedings of First Symposium on Host Specificity Among Parasites of Vertebrates. Neuchâtel: Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, 1957. P. 185–198.
- 61.Manter H.W. The structure and taxonomic position of *Megasolena estrix* Linton 1910 (Trematoda) with notes on related trematodes // Parasitology. 1935. Vol. 27. P. 431–439.
- 62.Martin W.E. Life history of *Saccocoelioides pearsoni* n. sp. and the description of *Lecithobotrys sprengi* n. sp. (Trematoda: Haploporidae) // Transactions of the American Microscopical Society. 1973. Vol. 92. P. 80–95.

63. Martorelli S.R. Estudios parasitologicas en biotopos lenticos de la Republica Argentina. III. El ciclo biologico *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842) (Pisces: Cichlidae) // Neotropica. 1988. Vol. 32. P. 125–132.
64. Mehra H.R. New superfamily Haploporoidea (suborder Echinostomata Szidat, 1939; Order Echinostomidae LaRue, 1957 syn. Fascioloidea Szidat, 1936) // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1961. Section B, Vol. 31. P. 383–384.
65. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. Equation of state calculations by fast computing machines // The Journal of Chemical Physics. 1953. Vol. 21. P. 1087–1092.
66. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1986. Vol. 51, No. 1. P. 263–273.
67. Narain K., Devi K.R., Agatsuma T., Blair D., Wickramashinghe S., Mahanta J. Direct Submission Submitted Parasitology. Regional Medical Research Centre, 2006.
68. Nasir P., Gomez Y. *Carassotrema tilapiae* n. sp. (Haploporidae Nicoll, 1914) from the freshwater fish, *Tilapia mossambica* (Peters), in Venezuela // Rivista di Parassitologia. 1976. Vol. 37. P. 207–228.
69. Nei M. Genetic distance between populations // The American Naturalist. 1972. Vol. 106. P. 283–292.
70. Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) // International Journal for Parasitology. 2003. Vol. 33. P. 733–755.
71. Overstreet R.M., Curran S.S. Family Haploporidae Nicoll, 1914 // Keys to the Trematoda / Eds. Jones A., Bray R.A., Gibson D.I. Wallingford: CAB International, 2005. Vol. 2. P. 129–165.
72. Pérez-Ponce de León G., Hernández-Mena D.I. Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on

- nuclear rDNA sequences before entering the age of the 'next-generation' Tree of Life // *Journal of Helminthology*. 2019. Vol. 93, No. 3. P. 260–276.
73. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics*. 1998. Vol. 14. P. 817–818.
74. Posada D. Using MODELTEST and PAUP\* to select a model of nucleotide substitution // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2003. Chapter 6, Unit 6.5.
75. Pulis E.E., Fayton T.J., Curran S.S., Overstreet R.M. A new species of *Intromugil* (Digenea: Haploporidae) and redescription of *Intromugil mugilicolus* // *Journal of Parasitology*. 2013. Vol. 99. P. 501–508.
76. Pulis E.E., Overstreet R.M. Review of haploporid (Trematoda) genera with ornate muscularisation in the region of the oral sucker, including four new species and a new genus // *Systematic Parasitology*. 2013. Vol. 84. P. 167–191.
77. Pulis E.E. Revision of 13 Genera of Haploporidae (Trematoda) // *Dissertations*. 2014. P. 84–114.
78. Rannala B., Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference // *Journal of Molecular Evolution*. 1996. Vol. 43. P. 304–311.
79. Rohlf F.J. Algorithm 76. Hierarchical clustering using the minimum spanning tree // *The Computer Journal*. 1973. Vol. 16. P. 93–95.
80. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4. P. 406–425.
81. Shameem U., Madhavi R. Observations on the life-cycles of two haploporid trematodes, *Carassotrema bengalense* Rekharani et Madhavi, 1985 and *Saccocoelioides martini* Madhavi, 1979 // *Systematic Parasitology*. 1991. Vol. 20. P. 97–107.
82. Sheena P., Janardanan K.P. The life cycle of *Hapladena gymnocephali* sp. nov. (Digenea: Haploporidae) from the bald glassy perchlet *Ambassis gymnocephalus* in Kerala, India // *Journal of Helminthology*. 2007. Vol. 81. P. 301–306.

83. Sneath P.H., Sokal R.R. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.
84. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
85. Tang Z., Lin H. Studies on *Carassotrema* Park, 1938 life-histories and distribution // Journal of Xiamen University. 1979. Vol. 1. P. 81–98.
86. Tavaré S., Miura R.M. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // Lectures on Mathematics in the Life Sciences. Providence, RI: American Mathematical Society, 1986. Vol. 17. P. 57–86.
87. 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.
88. Tkach V. Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea // Interrelationships of Platyhelminthes / Eds. Littlewood D.T.J., Bray R.A. London: Taylor & Francis, 2001.
89. Tran T., Long P., Balaraman D. The taxonomy key for Mugilidae in Vietnam // TAP CHI SINH HOC. 2015. Vol. 37, No. 1.
90. 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.
91. Whitfield A., Durand J.D. An overview of grey mullet (Mugilidae) global occurrence and species-rich ecoregions, with indications of possible past dispersal routes within the family // Journal of Fish Biology. 2023. Vol. 103. P. 202–219.
92. Yamaguti S. Parasitic worms mainly from Celebes. Part 1. New digenetic trematodes of fishes // Acta Medica Okayama. 1952. Vol. 8. P. 146–198.
93. Yamaguti S. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Tokyo: Keigaku Publishing Co., 1971. Vol. 2. 65 p.

94. Yiu S., Peng W., Liu S. *Carassotrema flecterotestis* (Zhukov, 1917) comb. nov. and observation of its miracidial development in vitro // Journal of Oceanography in Taiwan Strait. 2005. Vol. 24. P. 97–103.
95. Zhukov E.V. New trematodes of marine and freshwater fishes from the basins of the Japanese and Yellow seas // Parazitologiya. 1971. Vol. 5. P. 155–161.