

На правах рукописи



ШУМЕНКО  
ПОЛИНА ГЕННАДЬЕВНА

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

1.5.12. Зоология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в лаборатории паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук.

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Татонова Юлия Викторовна**

**Официальные оппоненты:** **Жохов Александр Евгеньевич**  
доктор биологических наук, ФГБУН  
«Институт биологии внутренних вод им.  
И.Д. Папанина» РАН, заведующий  
лабораторией экологической паразитологии  
**Чернышев Алексей Викторович**  
доктор биологических наук, доцент, ФГБУН  
«Национальный научный центр морской  
биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО  
РАН, главный научный сотрудник  
лаборатории эмбриологии

**Ведущая организация:** ФГБУН «Институт проблем экологии и  
эволюции им. А.Н. Северцова» РАН,  
г. Москва

Защита состоится «28» ноября 2023 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.253.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022 г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423) 2310-193. E-mail: [info@biosoil.ru](mailto:info@biosoil.ru)

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022 г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159, ученому секретарю диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2023г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
кандидат биологических наук  
совета,



Саенко  
Елена Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Восточноазиатский регион, частью которого является юг Дальнего Востока (ДВ) России, включает области, где наиболее широко представлены возбудители разных зоонозов. В силу исторических особенностей формирования фауны юга ДВ, на этой территории России наиболее богато представлено видовое разнообразие паразитических червей, имеющих эпидемиологическое значение. К настоящему моменту здесь зарегистрировано более 40 видов, числящихся как паразиты человека, и более 70 потенциальных паразитов человека (Ермоленко и др., 2020). Проблема гельминтозных инвазий человека достаточно актуальна в свете их высокой значимости в рамках системы здравоохранения, то есть изучение этих паразитов имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение.

К сожалению, на сегодняшний день информация о видовом составе, распространении и особенностях биологии возбудителей природноочаговых гельминтозов представлена не в полном объеме. Поэтому требуются комплексные исследования для отдельных регионов, включающие получение данных о видовом разнообразии возбудителей зоонозов, основанном на морфологических и молекулярных показателях, а также особенностях циркуляции паразитов. Только основываясь на таком подходе в исследованиях можно получить достоверную информацию о видовом составе региональных фаун, как паразитов в целом, так и возбудителей зоонозов. Получение информации о видовом составе гельминтов обеспечивает условия для планового мониторинга очагов зоонозов и контроля экспансии паразитов.

В составе рода *Metagonimus* до начала настоящего исследования числились 8 видов: *Metagonimus yokogawai* Katsurada, 1912, *M. takahashii* Suzuki, 1930, *M. miyatai* Saito, Chai, Kim, Lee & Rim, 1997, *M. hakubaensis* Shimazu, 1999, *M. katuradai* Izumi, 1935, *M. otsurui* Shimazu & Urabe, 2002, *M. minutus* Katzuta, 1932 и *M. ovatus* Yokogawa, 1913.

**Степень разработанности.** До настоящего исследования на юге Дальнего Востока России на основании морфологии стадий развития было установлено наличие двух видов *Metagonimus*, обозначенных как *M. yokogawai* и *M. katuradai*. Наряду с этим, для этих трематод были получены данные по их жизненным циклам, составу хозяев и распространению в пределах юга ДВ России (Беспрозванных, 2000; Беспрозванных, Ермоленко, 2005; Беспрозванных и др., 2013 и др.). При этом видовой статус червей не был подтвержден на молекулярном уровне, и, следовательно, не были проанализированы филогенетические связи с другими видами рода, а также не изучены особенности формирования и структуры популяции и ряд других характеристик, основывающихся на генетических данных.

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

Основные задачи исследования:

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

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

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

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

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

**Методология и методы диссертационного исследования.** Материал для исследования представителей рода *Metagonimus* был собран на юге ДВ России, включая территории Приморского и Хабаровского краев, а также Еврейской автономной области. Для установления видового статуса метагонимусов, а также оценки генетического разнообразия и

популяционной структуры *M. suisfunensis* в работе использовались методы классической паразитологии (изучение морфологии стадий развития) и молекулярно-генетические маркеры. Полученные нуклеотидные последовательности обработаны с помощью стандартных программ для анализа генетических данных.

**Положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

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

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах, иллюстрирована 17 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы насчитывает 146 наименований, из них 118 на иностранном языке.

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

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В главе представлен краткий обзор данных, включающий этапы изучения видов рода *Metagonimus*, в том числе, рассмотрены молекулярно-генетические методы, используемые для исследований филогенетических отношений и популяционной структуры разных трематод, включая червей из надсемейства Opisthorchioidea, в состав которых входят представители рода *Metagonimus*.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**2.1. Получение паразитологического материала.** В настоящей работе использован паразитологический материал для двух видов *Metagonimus*, обозначенных как *M. suifunensis* и *M. pusillus*. Обоснование выделения новых видов представлено в разделе 3.2.

Для получения марит *M. suifunensis* воспроизводили полный жизненный цикл в лабораторных условиях. Церкариями, выделяющимися из моллюска *Parajuga*, выловленного из реки Комаровка (бассейн р. Раздольная), заражали обыкновенных горчаков *Rhodeus sericeus sericeus*, отловленных в искусственном водоеме г. Владивостока после контроля зараженности метацеркариями трематод. На 35 сутки с момента инфицирования у рыб под чешуей были обнаружены метацеркарии *Metagonimus*, и рыбы были скормлены двум крысам. Также с целью получения материала для популяционного анализа *M. suifunensis* естественно зараженных рыб *Rhodeus sericeus sericeus* и *Phoxinus lagowskii* (гольян Лаговского) из рек Комаровка, Комиссаровка, Илистая, Одарка, Сорочевка, Арсеньевка Приморского края; рек Анюй, Одыр, Белая Хабаровского края и реки Бира Еврейской автономной области скормили лабораторным крысам (отдельно для каждого локалитета). На 13 сутки после инфицирования крысы были усыплены хлороформом и вскрыты. Все крысы заразились *M. suifunensis* с интенсивностью от 7 до 355 особей. Помимо этого, пять рыб *Rhodeus sericeus sericeus*, выловленных в реке Большая Уссурка, скормили утенку. Через 10 дней после заражения из тонкого кишечника были извлечены восемь марит *M. pusillus*. Экспериментальные работы проводились в соответствии с Положением о комиссии по регулированию экспериментальных исследований ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

**2.2 Исследование морфологии.** Сбор, фиксацию и приготовление постоянных препаратов для половозрелых червей проводили стандартными методами (Гинецинская, 1968). Промеры партенит и метацеркарий сделаны на живых особях, церкарий перед измерением фиксировали в горячем 4% формалине. Все размеры приведены в мм.

**2.3 Сканирующая электронная микроскопия.** Часть фиксированных половозрелых червей *Metagonimus suifunensis* использовали для исследования структуры поверхности тела с помощью сканирующей электронной

микроскопии. Образцы отмачивали в дистиллированной воде, затем промывали фосфатным буфером и переносили в 3% глутаральдегид. После этого образцы промыли в дистиллированной воде и провели через батарею спиртов с возрастающей концентрации от 20% до 100%. Далее производили напыление углеродом в приборе Quorum Q150TES (TESCAN, Россия). Электронные фотографии мариит получены при помощи микроскопа ZEISS EVO 40 (Carl Zeiss, Германия) на базе центра коллективного пользования Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток).

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

**2.5 Получение последовательностей ДНК.** Частичные последовательности гена 28S рРНК и полноразмерные последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, а также последовательности митохондриальных генов *cox1*, *cytb* и *nad1* амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием прямых и обратных праймеров для каждого фрагмента ДНК. Праймеры для получения полноразмерных последовательностей всех митохондриальных генов были разработаны в настоящей работе. Далее проводили реакцию секвенирования по Сэнгеру по стандартной методике. Полученные последовательности визуализировали в программе Finch TV 1.4.0, собирали и выравнивали вручную в программе MEGA 5.03 с использованием опции Clustal W (Tamura, 2011).

**2.6. Филогенетический анализ.** Для анализа филогенетических отношений помимо нуклеотидных последовательностей, полученных в настоящем исследовании, использовали последовательности представителей рода *Metagonimus*, доступных в базе данных NCBI на момент проведения настоящих исследований. В качестве внешней группы при построении филогенетических реконструкций выбрали вид *Notocotylus magniovatus*, поскольку согласно работе Накао и Сасаки (Nakao, Sasaki, 2021), максимально близкой группой, занимающей базальное положение по отношению к представителям рода *Metagonimus*, были черви из семейства Notocotylidae. Для получения филогенетических реконструкций применяли следующие программы: jModeltest 2.1.5 (Darriba et al., 2012), PhyML (Guindon, Gascuel, 2003) и MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003).

**2.7. Популяционный анализ.** В исследовании был проведен анализ популяционной структуры *Metagonimus suifunensis* на основе полноразмерных последовательностей генов *cox1*, *cytb* и *nad1* мтДНК, а также объединенного массива данных. С помощью программы MEGA оценили полиморфизм последовательностей, изменчивость аминокислот и генетические дистанции между образцами и кластерами. С использованием программы DnaSP 5.10 (Librado, Rozas, 2009) оценили количество гаплотипов (*H*), вариабельных сайтов (*S*), уровень нуклеотидного (*p*) и гаплотипического (*Hd*) разнообразия (Hudson, 1990). В этой же программе построили графики

распределения нуклеотидных замен вдоль последовательностей (Rogers, Harpending, 1992), а также построили графики распределения попарных генетических различий, отражающий демографическую историю популяции. Для реконструкции генеалогических связей между гаплотипами мтДНК сконструировали минимальное остовное дерево (MST) в программе Arlequin 3.11 (Rogers, 1992). В программе Arlequin для оценки генетического равновесия в популяции рассчитали индексы тестов на нейтральность – Фу  $F_s$  (Fu, 1997) и Таджимы  $D$  (Tajima, 1989). Среднеквадратическое отклонение ( $SSD$ ) и индекс шероховатости Харпендинга ( $Hri$ ) использовали для проверки, отклоняются ли наблюдаемые распределения от ожидаемых в соответствии с моделью роста популяции (Harpending, 1994). Оценку вероятностей наблюдаемых значений обеих статистик провели с использованием коалесцентного процесса на основе моделирования. Программу Arlequin также использовали для оценки потока генов ( $Nm$ ). При анализе данного параметра учитывали, что митохондриальный геном является гаплоидным (Takahata, Slatkin 1984). В работе использовали скорость замены нуклеотидов 2,5% на миллион лет для расчета времени дивергенции видов (Attwood et al., 2008).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**3.1. Морфологические и генетические данные для представителей рода *Metagonimus*.** Представители рода *Metagonimus* Katsurada, 1912 занимают следующее систематическое положение (по Pearson, 2008): тип Плоские черви – Platyhelminthes Gegenbaur, 1859; класс Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808; подкласс Дигенетические сосальщики – Digenea Carus, 1863; отряд Opisthorchiida La Rue, 1957; надсемейство Opisthorchioidea Looss, 1899; семейство Heterophyidae Leiper, 1909.

В настоящей работе описано два новых эндемичных вида, осуществляющих циркуляцию на Дальнем Востоке России. Обоснование выделения этих видов представлено в разделе 3.2.

*Metagonimus suifunensis* Shumenko, Tatonova & Besprozvannykh, 2017. Синоним – *Metagonimus yokogawai* Katsurada, 1912 (по Скрыбин, 1930; Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных, 1987; Беспрозванных, 2000). Голотип № Tr-74 (р. Комаровка) и паратипы № Tr-75-83 депонированы 20.11.2015 в паразитологическую коллекцию Зоологического Музея (Федеральный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия).

Морфологические данные. Для *M. suifunensis* представлены данные по морфологии и морфометрии разных стадий развития: мариты, реди, церкарии и метацеркарии (рисунок 1). Помимо этого, впервые для половозрелых особей этого вида изучена ультраструктура тегументальных шипиков на поверхности тела (рисунок 2).

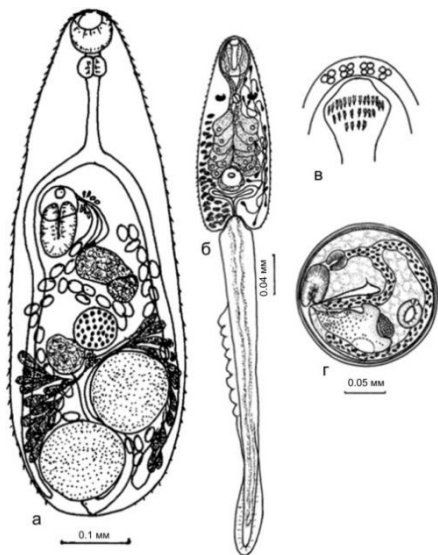


Рисунок 1 – *Metagonimus suisfunensis*:  
 а – марита, б – церкария,  
 в – расположение крючьев ротовой присоски церкарий и пор протоков желез, г – метацеркария

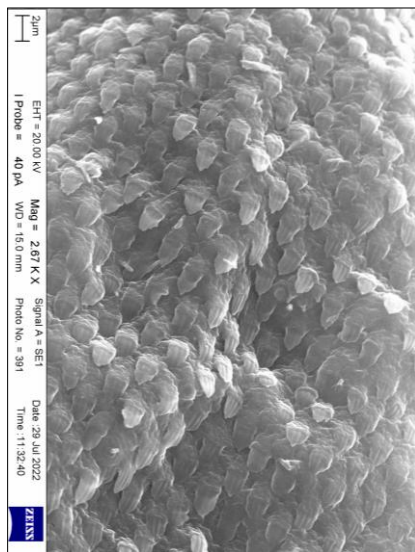


Рисунок 2 – Вентральная поверхность переднего конца тела мариты *Metagonimus suisfunensis* (электронная фотография)

Молекулярно-генетические данные. Для *M. suisfunensis* получено пять последовательностей гена 28S рРНК длиной 1402 п.н., которые идентичны внутри вида. Также проанализированы 64 последовательности участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК длиной 1134 п.н., среди которых обнаружена только одна замена А→Г в участке ITS1 рДНК и выявлен внутригеномный полиморфизм G/A в участке ITS2 рДНК для образцов KX387502 и KX387484 соответственно.

Комбинированные полноразмерные последовательности трех митохондриальных генов (*cytb*, *nad1* и *cox1*) имеют общую длину 3576 п.н., что составило 23,4% длины от единственного полного митохондриального генома, представленного в базе данных NCBI для *M. yokogawai* (KC330755).

Полноразмерные последовательности гена *cox1* мтДНК *M. suisfunensis* длиной 1539 п.н. отличались друг от друга на 19 транзаций и одну трансверсию. Три из них были парсимоний-информативными. По две несинонимичных замены обнаружено в двух образцах из р. Арсеньевка и в двух образцах из р. Одыр. Уровень отличий внутри выборки по гену *cox1* мтДНК составил 0,9%. Для *M. suisfunensis* стоп-кодоном гена *cox1* мтДНК является TAG.

Длина полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *cytb* мтДНК составила 1128 п.н., стоп-кодом этого гена для *M. suifunensis* является триплет ТАА. Между *M. suifunensis* и *M. yokogawai* обнаружена 161 фиксированная нуклеотидная замена и 23 фиксированные несинонимичные замены. В последовательностях гена *cytb* мтДНК *M. suifunensis* (внутри вида) выявлено 36 транзиций и 6 трансверсий, 10 из них были информативными. Для полных последовательностей гена *cytb* мтДНК обнаружено 30 полиморфных сайтов, из них 7 информативных; 13 несинонимичных замен, 4 из которых были информативными. Уровень отличий внутри выборки по гену *cox1* мтДНК составил 1,7%.

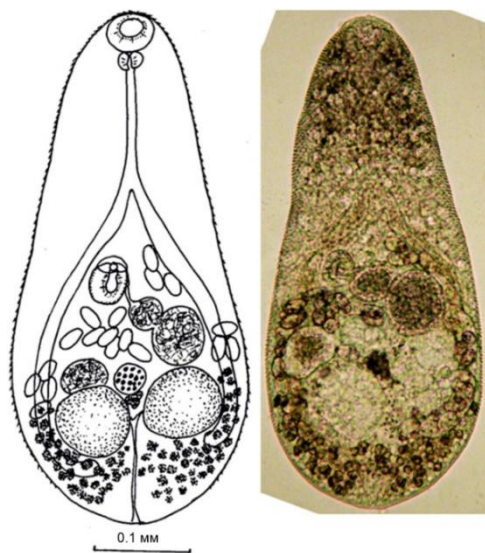


Рисунок 3 – *Metagonimus pusillus*, марица

Длина 56 полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена *nad1* мтДНК *M. suifunensis* составила 909 п.н. Стоп-кодон – ТАА. По данным этого маркера выявлено 27 переменных сайтов, 7 из которых были информативными; 9 замен были несинонимичными, одна из них информативная. Уровень отличий внутри выборки по гену *cox1* мтДНК составил 1,5%.

*Metagonimus pusillus*  
Tatonova, Shumenko & Besprozvannykh, 2018. Синоним – *Metagonimus katsuradai* Izumi, 1935 (по Беспрозванных, 1987, 2000). Голотип № Tr-114 и паратипы № Tr-115-118 хранятся в паразитологической коллекции Зоологического музея ФНЦ

Биоразнообразия ДВО РАН. Для этого вида получены данные по морфологии мариц (рисунок 3), а также молекулярно-генетические данные для двух образцов: частичные последовательности для гена 28S рРНК длиной 1403 п.н., полноразмерный участок ITS1-5.8S-ITS2 рДНК длиной 1144 п.н. и частичные последовательности гена *cox1* мтДНК длиной 339 п.н. По всем трем маркерам последовательности *M. pusillus* были идентичны друг другу.

**3.2. Обоснование валидности дальневосточных представителей рода *Metagonimus*.** Анализ собственных результатов и ранее опубликованных работ показывает, что виды рода *Metagonimus* можно разделить на 2 группы: крупные с длиной тела более 0,65 мм – *M. yokogawai*, *M. takahashii* и *M. miyatai* и более мелкие – *M. hakubaensis*, *M. minutus*, *M. katsuradai*,

*M. otsurui* и *M. ovatus*. По размерам тела *M. suifunensis* соответствует первой группе трематод, а *M. pusillus* относится ко второй.

Морфологические и морфометрические показатели половозрелых особей и церкарий *M. suifunensis*, обнаруженных в настоящем исследовании, совпадают с данными для червей, ранее известных на ДВ России как *M. yokogawai* (Ошмарин, 1963; Шатров, 1974; Беспрозванных и др., 1987). Между половозрелыми особями этих трематод имеются только незначительные расхождения в размерах тела и органов. Исходя из выше сказанного, обсуждаемые черви принадлежат одному виду.

Помимо морфометрического сходства дальневосточных червей с особями *M. yokogawai* из типового места обнаружения (Япония), по большинству метрических показателей половозрелые черви из настоящего исследования сходны и с *M. takahashii* и *M. miyatai*. Установлено, что *M. suifunensis* обладает меньшими размерами тела, чем три упомянутых выше вида. Наряду с этим, *M. suifunensis* отличается от *M. yokogawai* большими показателями соотношения длины переднего конца тела к его длине и большим размером яиц, а от *M. takahashii* описываемый нами вид отличается меньшим размером яиц. Отличия *M. suifunensis* от этих трех видов хорошо просматриваются и в деталях тонкого строения тегументальных шипиков на разных участках поверхности тела (Lee et al., 1987; Chai et al., 2000). Таким образом, совокупность всех морфометрических и морфологических показателей свидетельствует о валидности дальневосточных червей, которым мы присвоили название *M. suifunensis*.

Видовая самостоятельность дальневосточных червей, обозначенных как *M. suifunensis*, также подтверждается и с использованием молекулярно-генетических данных. На реконструкциях филогенетических связей внутри рода *Metagonimus* на основе последовательностей гена 28S рРНК (рисунок 4), участка ITS2 рДНК и гена *cox1* мтДНК, *M. suifunensis* формирует отдельные ветви с высокой поддержкой, а от ближайших видов отличается согласно данным по трем маркерам на 0,7%, 1,2 и 14% соответственно. Все указанные значения генетических дистанций лежат в диапазоне межвидовых отличий (Pornruseetairatn et al., 2016). *Metagonimus suifunensis* отличается на 1,85% от ближайшего по морфологическим данным вида *M. yokogawai* и по полноразмерным последовательностям участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК. Ещё один критерий, который отделяет *M. suifunensis* от *M. yokogawai*, – это разные стоп-кодоны у генов *cox1* (TAG vs TAA), *cytb* (TAA vs TAG) и *nad1* (TAG vs TAA) мтДНК.

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

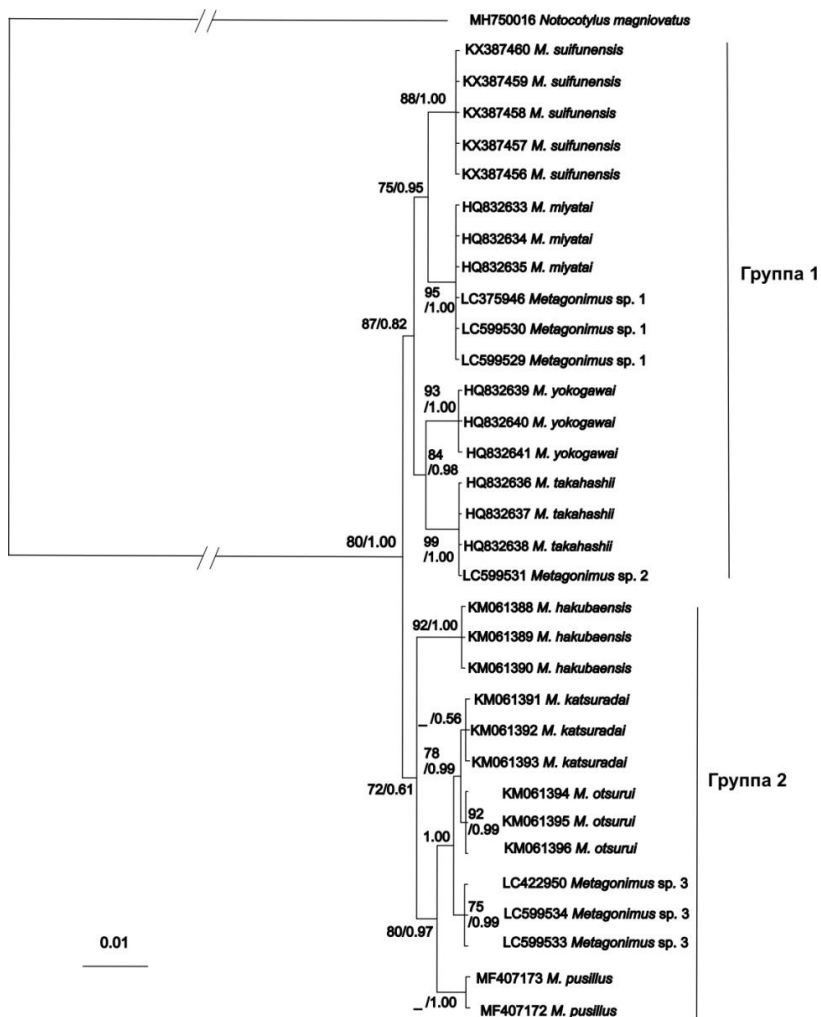


Рисунок 4 – Филогенетические отношения видов рода *Metagonimus* на основе последовательностей гена 28S рРНК. В узлах ветвей указаны значения бутстреп-поддержки/апостериорной вероятности (> 50%) для деревьев ML/BI соответственно. Внешняя группа – *Notocotylus magniovatus* (MH750016)

*Metagonimus pusillus* значительно отличается по размерам тела, присосок, глотки и других параметров от двух других мелких представителей рода – *M. hakubaensis* и *M. minutus*. Черви в нашем материале отличаются от *M. otsurui* и по соотношению частей семенного пузырька: передняя часть пузырька у *M. otsurui* крупнее, чем задняя, а у *M. pusillus* передняя часть

имеет меньшие размеры (Shimazu, 2002). Также эти виды имеют отличия в максимальных размерах большинства органов. От особей *M. katsuradai* из Японии полученные нами черви отличаются длиной глотки, максимальными размерами семенников и яичника (Shimazu, 2003) и максимальной шириной тела (Izumi, 1935, цит. по Ito, 1964b). Принадлежность дальневосточных червей *M. pusillus*, *M. katsuradai* и *M. otsurui* разным видам подкрепляется и имеющимися между ними морфометрическими различиями на стадии церкарии. Таким образом, совокупность всех морфометрических и морфологических показателей свидетельствует о принадлежности дальневосточных червей в настоящем исследовании новому виду, которому дано название *M. pusillus*.

Отличия *M. pusillus* на морфологическом уровне подтверждаются и молекулярно-генетическими данными. На реконструкциях филогенетических связей по гену 28S рРНК (рисунок 4), участку ITS2 рДНК и гену *cox1* мтДНК, *M. pusillus* формирует отдельные ветви с высокой бутстреп-поддержкой/апостериорной вероятностью, а от ближайших видов отличается согласно данным по трем маркерам на 0,6, 0,5 и 9,5% соответственно. Совокупность разных критериев подтверждает валидность *M. pusillus*.

После опубликования работ по видам *M. suifunensis* и *M. pusillus* (Shumenko et al., 2017; Tatonova et al., 2018) в Японии были описаны ещё 4 вида рода *Metagonimus* (Nakao et al., 2022). Авторы подчеркивают, что эти паразиты отличаются от видов, описанных на территории юга ДВ России, как по морфологическим критериям, так и согласно молекулярным маркерам. А в августе 2023 г. были впервые опубликованы молекулярно-генетические данные для представителя рода *Metagonimus* из Европы (Cech et al., 2023). Авторы отмечают, что вид хорошо дифференцируется не только от вида *M. yokogawai* из Японии, но и от всех азиатских видов.

**3.3. Филогенетические отношения внутри рода *Metagonimus*.** Как упоминалось выше, виды рода *Metagonimus* подразделяются по размерам тела, что подтверждается реконструкцией филогенетических связей внутри рода на основе последовательностей гена 28S рРНК (рисунок 4). Отдельные ветви объединили последовательности, относящиеся к девяти отдельным видам. Дистанции между видами рода *Metagonimus* по маркеру 28S варьируют в диапазоне от 0,1% до 1,9%.

В отличие от гена 28S рРНК, по данным гена *cox1* мтДНК, как и в случае с последовательностями участка ITS2 рДНК, виды не разделяются на кластеры по размерам тела. Тем не менее, данный маркер, как и участок ITS2 рДНК, достоверно дифференцирует виды рода *Metagonimus*: дистанции внутри видов рода *Metagonimus*: по данным частичной последовательности *cox1* варьировали от 0 до 0,4%, тогда как дистанции между видами существенно отличались и составляли от 9,5 до 18,3 %.

В 2022 году Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) также использовали нуклеотидные последовательности гена 28S рРНК для построения

филогенетических отношений внутри рода *Metagonimus*. И если два из четырех новых видов, описанных авторами, значительно отличались от всех представителей рода по гену 28S рРНК, то *M. kinoi* был идентичен *M. katsuradai*, а *M. kogai* – *M. takahashii* (Nakao et al., 2022). Митохондриальный маркер (ген *cox1* мтДНК) оказался более эффективным для выделения криптических видов, описанных в работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022). Генетические дистанции по гену *cox1* мтДНК между *M. takahashii* и *M. kogai* составили 6,8%, а между *M. kinoi* и *M. katsuradai* – 8,1%, тогда как дистанции внутри всех видов *Metagonimus* не превышали 0,7% (Nakao et al., 2022). Таким образом, авторы уточнили для митохондриального маркера нижнюю границу межвидовых отличий внутри исследуемого рода и обозначили её как 6,8%, тогда как в нашей работе минимальное значение составило 9,5%.

Таким образом, молекулярные данные для червей из рода *Metagonimus*, полученных нами в результате экспериментальных исследований показали, что разные маркеры можно использовать для разных целей. Данные по гену 28S рРНК согласуются с морфологическими признаками, разделяющими все виды рода *Metagonimus* на две группы, что упрощает использование диагностических ключей для трематод с разными размерами тела. Два других маркера предоставляют дополнительные критерии для разделения видов, что особенно важно в случае проблемы разделения криптических видов.

**3.4. Ареалы представителей рода *Metagonimus*.** Большинство описанных видов рода *Metagonimus* (12 из 14) циркулируют на территории Японии (Nakao et al., 2022). На континентальной части этого региона с использованием молекулярно-генетического анализа выявлены виды *M. yokogawai*, *M. suifunensis* и *M. pusillus* (Shumenko et al., 2017; Tatonova et al., 2018). На настоящий момент перекрывание ареалов *M. yokogawai* и *M. suifunensis*, циркулирующих на континентальной части Восточной Азии, не обнаружено. Согласно генетическим данным, *Metagonimus* из Кореи (KC330755) идентичен частичным последовательностям гена *cox1* мтДНК *M. yokogawai* из Японии, то есть этот вид распространен в Корее и Японии. *Metagonimus suifunensis* пока обнаружен только на юге ДВ России, на территории которой пока не подтверждено наличие *M. yokogawai*. Исходя из значений генетических отличий между *M. yokogawai* и *M. suifunensis* по полноразмерным последовательностям гена *cox1* мтДНК, выявленных в настоящем исследовании, эти виды разошлись в позднем миоцене. В этот период произошло понижение уровня Японского моря, а также поднятие отдельных участков земной коры, что привело к объединению Сахалина и Хоккайдо с материком на севере (Матюшков и др., 2014). Вероятно, существовал обмен малакофауной (и их паразитами) между Японией (Хоккайдо), Сахалином и ДВ России. Позднее в результате Япономорской трансгрессии в плиоцене значительная часть Сахалина была затоплена (Богатов и др., 2006), и обмен

фаунами стал невозможным. Позже, в последний климатический минимум позднего плейстоцена, снова возник сухопутный мост, соединяющий Хоккайдо, Сахалин и материк (Короткий и др., 1996; Богатов и др., 2006). На юге остров Кюсю (Япония) и Корейский полуостров разделил только узкий пролив. Воды полузамкнутого Японского моря, ограниченного сушей, были опреснены во время последнего ледникового максимума (24-18 тыс. лет назад). Все перечисленные выше условия обеспечивали свободный обмен элементов фауны. Тем не менее, континентальная популяция *M. suiifunensis*, по-видимому, была изолирована на юге ДВ России, так как, помимо падения уровня моря, поздний плейстоцен характеризовался наличием ледникового периода (Короткий и др., 1996; Lee et al., 2008). В связи с этим, первый промежуточный хозяин *Metagonimus* не мог распространиться в более северные и холодные части палео-Амура. Вследствие независимой эволюции образовались два морфологически сходных вида, *M. suiifunensis* и *M. yokogawai*. В то же время миграция *M. yokogawai* между южными Японскими островами и Корейским полуостровом была легко осуществима во время регресса в позднем плейстоцене. Относительно недавний распад сухопутных связей между Японией и Кореей обеспечили сохранение общих черт морфогенеза *M. yokogawai* на этих территориях. Что касается дальнейшего расселения *M. suiifunensis*, то с большой долей вероятности, проникновение паразита на территорию ДВ России происходило через бассейн реки Амур в южные районы региона, бассейны реки Уссури, озера Ханка и реки Раздольная. Об этом свидетельствуют данные, полученные при молекулярных исследованиях *M. suiifunensis* из различных локалитетов юга ДВ России.

**3.5. Современная структура популяции *Metagonimus suiifunensis* и ее формирование.** До настоящего исследования для представителей надсемейства Opisthorchioidea на территории юга Дальнего Востока России генетическая структура популяции была изучена только для *C. sinensis* (Chelomina et al., 2014; Tatonova et al., 2017). *Metagonimus suiifunensis* имеет общее эволюционное прошлое с китайской печеночной двуусткой. Оба вида имеют сходный жизненный цикл. Более того, на территории Северо-Восточной и Восточной Азии ареалы этих паразитов перекрываются. Это позволяет их считать идеальными модельными объектами для проведения сравнительного анализа структуры их популяций.

Оценка популяционной структуры *M. suiifunensis* в настоящей работе проведена на основе нуклеотидных последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК. Полноразмерный участок ITS1-5.8S-ITS2 рДНК проанализирован для 64 образцов *M. suiifunensis* из шести локалитетов Приморского края. Образцы *M. suiifunensis* по данному маркеру практически не отличаются друг от друга. В противоположность этому, популяция *C. sinensis* имеет более высокую изменчивость в участке ITS рДНК, включая наличие инделов (Tatonova et al., 2017).

Для анализа объединенных данных количество последовательностей для *M. suifunensis* по всем трем митохондриальным генам (*cytb*, *nad1*, *cox1*) приведено к единому значению – 56 образцов. Анализ полной последовательности гена *cox1* мтДНК показал, что по данному маркеру существенных различий между выборками из разных локалитетов не обнаружено. Все параметры разнообразия для *M. suifunensis* были ниже, чем выявлено для *C. sinensis*, циркулирующего на той же территории (Tatopova et al., 2019). В общей выборке *M. suifunensis* наибольшее количество последовательностей гена *cox1* мтДНК (25%) имеет синонимичную замену в позиции 762 п.н. Возможно, в популяции *M. suifunensis* идет отбор особей с этой заменой, однако значение мутации для паразита остается под вопросом.

Низкий уровень изменчивости *M. suifunensis* по гену *cox1* мтДНК сопровождается наличием простой звездообразной структуры MST, состоящей из анцестрального гаплотипа, а также периферических гаплотипов с низкой частотой встречаемости и малым количеством мутационных шагов (рисунок 5а).

График распределения попарных генетических различий по гену *cox1* мтДНК унимодален (рисунок 6а), что свидетельствует об экспансии паразита. Этот результат сочетается со значительным отрицательным значением теста Фу *F<sub>s</sub>*, что также указывает на недавний рост численности популяции с небольшим эффективным размером (Fu, 1997; Excoffier, 1999, таблица 1). Кроме того, график имеет L-образную форму, а пик находится в диапазоне 0-1, что указывает на влияние эффекта «бутылочного горлышка» на популяцию паразита в недавнем прошлом. Эта гипотеза подтверждается показателем теста нейтральности Таджимы, которое имеет значительное отрицательное отклонение от нуля (Tajima, 1989, таблица 1). Таким образом, данные по гену *cox1* мтДНК позволяют предположить, что в недавнем времени произошло резкое сокращение численности популяции *M. suifunensis* на юге ДВ России. Это снижение привело к уменьшению генетического разнообразия *M. suifunensis*, в отличие от популяции *C. sinensis*, которая, по-видимому, не была подвержена воздействию эффекта «бутылочного горлышка» (Chelomina et al., 2014).

В работе Накао с соавторами (Nakao et al., 2022) для разных видов рода был использован более короткий фрагмент данного маркера (801 п.н.), то есть последовательности были в 2 раза короче анализируемых в настоящем исследовании. Для *M. miyatai* из Японии частичные последовательности гена *cox1* мтДНК оказались достаточно чувствительными для оценки микроэволюционных процессов, несмотря на то, что даже полноразмерные последовательности гена *cox1* мтДНК не смогли выявить популяционную структуру *M. suifunensis* на территории юга ДВ России, также как и частичные последовательности этого гена оказались неэффективными при оценке изменчивости для другого японского вида – *M. saitoi*.

Анализ гена *cytb* мтДНК для *M. suifunensis* также показал низкую изменчивость, аналогично гену *cox1* мтДНК. Но показатели нуклеотидной и

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

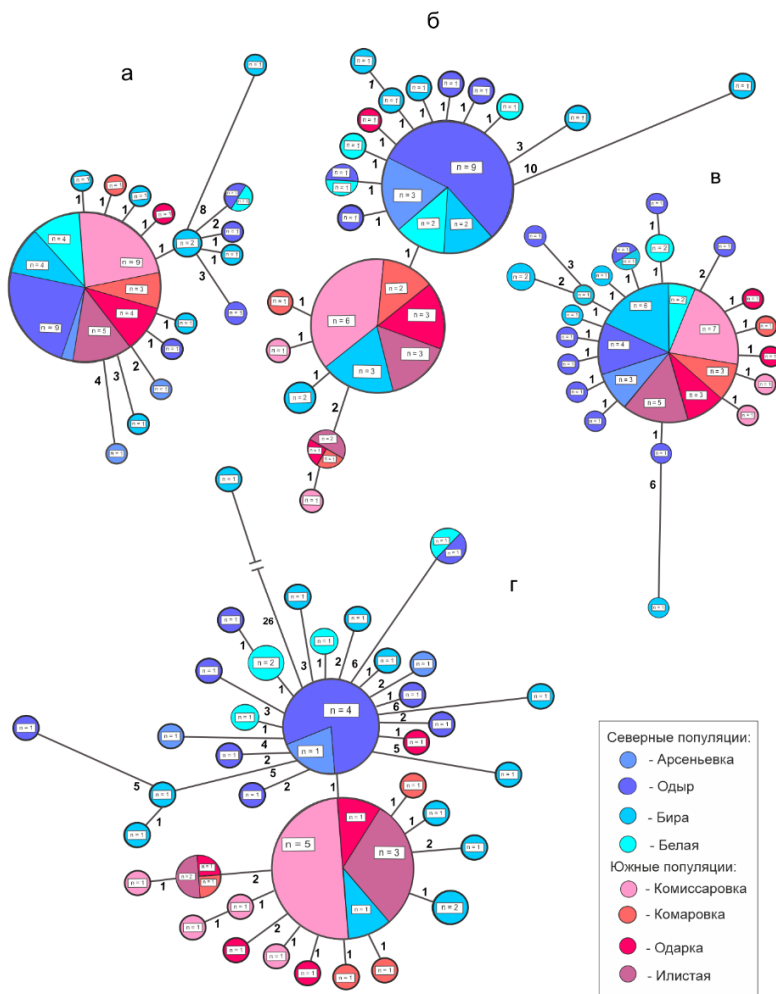


Рисунок 5 – Реконструкция MST для гаплотипов *Metagonimus suis* на основе последовательностей: а – *cox1*, б – *cytb*, в – *nad1*, г – комбинированного набора данных по трем митохондриальным маркерам. Числами обозначено количество нуклеотидных замен между последовательностями; *n* – количество образцов в гаплотипе

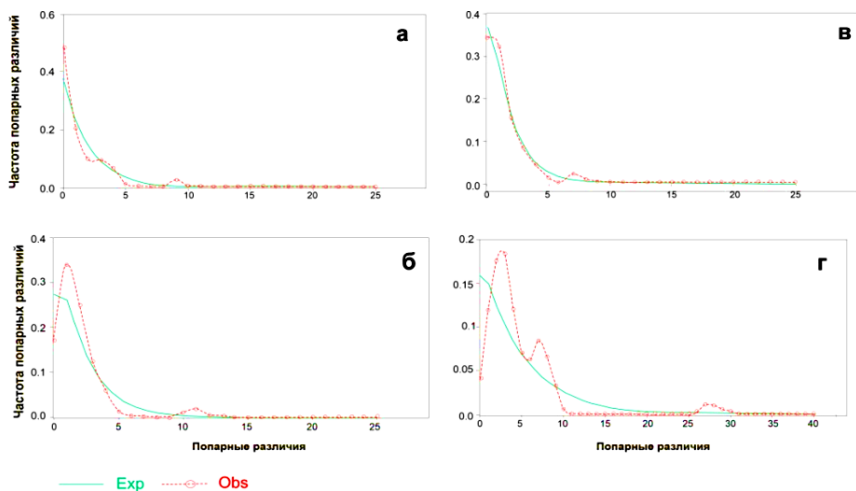


Рисунок 6 – Распределение попарных генетических отличий для последовательностей митохондриальных генов: а – *cox1*, б – *cytb*, в – *nad1*, г – комбинированного набора данных из трех маркеров

Таблица 1 – Статистика теста нейтральности и параметры демографической экспансии для полной выборки *Metagonimus suifunensis*

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

*SSD* – сумма квадратных отклонений; *HRI* – индекс шероховатости.  
*P* – стандартная ошибка

Несмотря на низкое генетическое разнообразие, ген *cytb* мтДНК выявил северную и южную гаплогруппы, которые связаны с географическим распространением *M. suifunensis* на ДВ России. Эти группы включают сходное количество образцов: в южную гаплогруппу вошло 27 последовательностей, а северная гаплогруппа объединила 29 паразитов (рисунок 5б). Каждая гаплогруппа имеет звездообразную структуру и помимо анцестрального гаплотипа включает гаплотипы следующего порядка.

Географическая граница между образцами из северной и южной гаплогрупп проходит между бассейнами рек Арсеньевка и Сорочевка.

Отнесение образцов из реки Арсеньевка к северным субпопуляциям основывается на том, что эта река впадает в реку Уссури, и фактически её водное русло связано с бассейном Амура севернее реки Сунгач.

Большинство южных гаплотипов представлено образцами *M. suifunensis* из рек, впадающих в бассейн озера Ханка. В эту гаплогруппу также включены образцы из реки Комаровка, которая является притоком реки Раздольная. Несмотря на то, что бассейн этой реки в настоящее время не связан с озером Ханка, до среднего плейстоцена она также входила в состав палео-Амура и впадала в озеро Ханка (Белянина и др., 2009).

Единственным водотоком, соединяющим южную и северную субпопуляции, является река Сунгач, через которую, вероятно, в обоих направлениях ограничена миграция промежуточных хозяев *M. suifunensis*. Изоляция северных и южных субпопуляций, которая сохраняется, несмотря на то, что окончательные хозяева паразита могут совершать более длительные миграции, вызвала формирование различий между гаплогруппами, а именно наличие фиксированной несинонимичной замены, которая локализуется рядом с функциональным центром белка, отвечающим за транспорт электронов. Такое расположение может свидетельствовать о наличии внутри популяции *M. suifunensis* отбора, так как оба варианта, по-видимому, влияют на адаптационные способности паразита к различным климатическим условиям севера и юга Дальнего Востока России.

Сходный тип изоляции, связанный с первыми и вторыми промежуточными хозяевами выявлен и в выше упомянутой статье Накао с соавторами (Nakao et al., 2022), в которой для *Metagonimus miyatai* обнаружена географическая подразделенность внутри вида на западные и восточные группы. Авторы высказали гипотезу (Nakao et al., 2022), что на популяционную структуру паразита существенное влияние оказывает первый промежуточный хозяин. Ранее на территории Японии было выявлено (Miura et al., 2020), что представители рода *Semisulcospira*, являющиеся первыми промежуточными хозяевами некоторых видов рода *Metagonimus*, подразделяются на несколько клад, которые распределены в разных частях островов Японии, что совпадает распределением гаплогрупп *Metagonimus miyatai*. Как менее мобильные хозяева, моллюски могут ограничивать распространение паразитов. Однако данный вопрос требует дополнительных исследований, в том числе, на континентальной части Восточной Азии, на которой циркулирует *M. suifunensis*.

Помимо выявленной изоляции между двумя гаплогруппами, в северных субпопуляциях *M. suifunensis* были обнаружены пять образцов, принадлежащих к южной гаплогруппе и составляющих 19% от общего количества последовательностей в этой гаплогруппе. То есть миграция паразита в настоящее время происходит преимущественно в направлении с юга на север, что оказывает влияние на то, что последовательности гена *cytb* мтДНК из северной гаплогруппы *M. suifunensis* имеют более высокие значения изменчивости по сравнению с южной гаплогруппой, а количество

гаплотипов – в два раза больше, чем в выборке, включающей образцы из южных субпопуляций (таблица 2). В противоположном направлении (с севера на юг) поток генов, по-видимому, менее интенсивен, так как в северной гаплогруппе был идентифицирован только один образец из южного локалитета (р. Одарка).

Таблица 2 – Описательная статистика генетической изменчивости последовательностей гена *cytb* мтДНК для двух гаплогрупп и полной выборки *Metagonimus suifunensis*

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

*n* – количество последовательностей; *H* – количество гаплотипов; *S* – количество полиморфных сайтов;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие ( $\pm$  стандартная ошибка); *Hd* – гаплотипическое разнообразие ( $\pm$  стандартная ошибка).

Что касается третьего маркера, используемого в данной работе, показатели изменчивости для последовательностей гена *nad1* мтДНК выше, чем у гена *cox1* мтДНК, но ниже, чем для гена *cytb* мтДНК. Распределение нуклеотидных замен по последовательности гена *nad1* равномерно, а пик графика распределения попарных нуклеотидных замен находится в диапазоне 0-1 (рисунок 6в), как и для двух других митохондриальных маркеров. Гаплотипическая сеть для гена *nad1* мтДНК имеет простую звездообразную структуру с одним предковым гаплотипом и 20 гаплотипами следующего уровня и не выявляет какого-либо разделения внутри популяции *M. suifunensis* (рисунок 5в).

На гаплотипической сети MST по данным комбинированных последовательностей, включающих все три митохондриальных гена (*cytb*, *nad1*, *cox1*) все образцы паразита также разделились на северную и южную гаплогруппы (рисунок 5г), как и по данным гена *cytb* мтДНК. Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие выше для особей *M. suifunensis* из северной гаплогруппы в сравнении с южной. Известно, что географический центр формирования вида чаще всего располагается на территории с оптимальными условиями существования и характеризуется наличием более высокого уровня генетической изменчивости, тогда как уменьшение числа вариантов аллелей является характерным показателем для вида на его периферии (Lesica, Allendorf, 1995; Bunnell, Campbell, 2004). В связи с этим, центр формирования популяции *M. suifunensis* находится в пределах территории, занимаемой особями из северных субпопуляций.

Совокупность данных по всем митохондриальным маркерам позволила выявить особенности популяционной структуры *M. suiifunensis*, которые не определялись при анализе последовательностей отдельных генов. На реконструкции MST предковый гаплотип северной гаплогруппы объединил 4 особи (рисунок 5г), полученные от метацеркарий из рыб реки Одыр, то есть уточнена область, которая является центром формирования северной гаплогруппы (рисунок 7а). Что касается южных частей ареала *M. suiifunensis*, то, поскольку предковый гаплотип южной гаплогруппы включает образцы из трех южных локалитетов (рисунок 5г), точное географическое местонахождение центра образования для южных субпопуляций неизвестно, однако, несомненно, он сформировался в бассейне озера Ханка.

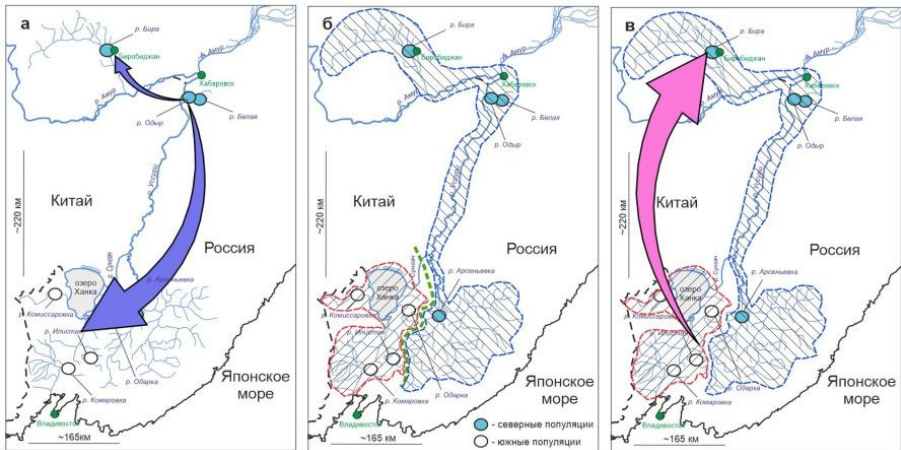


Рисунок 7 – Гипотетические эволюционные процессы в популяции *Metagonimus suiifunensis*: а – распространение паразитов из центра формирования северной гаплогруппы (река Одыр), б – изоляция между северными и южными субпопуляциями, в – миграция паразитов из южных локалитетов до реки Бира. Зеленой штриховой линией отмечен водораздел между северными и южными субпопуляциями

Уровень *Fst*, полученный на основе сравнительного анализа образцов из северных и южных субпопуляций *M. suiifunensis*, показал высокое значение дифференциации (0,16; большая дивергенция согласно Wright, 1978). Однако внутри этих субпопуляций значения *Fst* также составили 0,15 и 0,18 соответственно, что говорит о том, что они неоднородны. Об отсутствии полного обособления свидетельствует и высокое значение потока генов ( $Nm = 2,65$ ) между субпопуляциями *M. suiifunensis* в северной и южной частях изучаемого региона по данным комбинированной последовательности.

Предположительно, изоляция между южными и северными субпопуляциями возникла до среднего плейстоцена (рисунок 7б), когда произошла переориентация реки Раздольная в южном направлении (Белянина и др., 2009). В среднем плейстоцене уже сформировалась палео-Ханка. Озеро за последние 200 тысяч лет претерпело 4 периода регрессии, которые повлияли на температурные оптимумы в регионе (Zhu et al., 2011). В указанный период река Сунгач могла частично обмелеть и изолировать промежуточных хозяев, обитающих в разных частях бассейна реки Амур, что привело к обособлению субпопуляций *M. suifunensis*. Косвенным подтверждением предположения о влиянии промежуточных хозяев на структуру популяции *M. suifunensis* является изоляция, выявленная для другого представителя семейства Heterophyidae, *Haplorchis taichui* из Вьетнама, которая связана с существованием паразитов в разных речных бассейнах и невозможностью миграции промежуточных хозяев (Dung et al, 2013). И, как упоминалось выше, сходный тип изоляции обнаружен у другого представителя рода *Metagonimus* из Японии (Nakao et al., 2022).

После длительной изоляции, позволившей сформировать две гаплогруппы *M. suifunensis*, континентальная миграция возникла в северном направлении: от бассейна озера Ханка через Китай к субпопуляции из реки Бира (рисунок 7в). Поток генов осуществлялся путем миграции окончательных хозяев, поскольку Бира не относится к южным локалитетам, но выборка из этой реки включает 42% южных гаплотипов. Направление миграции, а также её односторонность свидетельствует о том, что особи паразита могли переноситься птицами, поскольку они способны к длительным перелетам. Но поскольку выборки паразита были получены из небольшого количества локалитетов Приморского и Хабаровского краев, не исключено, что миграционные маршруты *M. suifunensis* происходят не через Китай и осуществляются за счет млекопитающих.

Как по отдельным генам мтДНК, так и для комбинированной последовательности по всем трем маркерам (гены *nad1*, *cytb* и *cox1* мтДНК) значения обоих тестов нейтральности свидетельствует о росте популяции с большим количеством редких гаплотипов. Полученные результаты коррелируют с унимодальными графиками распределения попарных отличий для отдельных маркеров. Напротив, мультимодальный график для объединенных данных (рисунок 6г) можно интерпретировать как демографическое равновесие популяции (Rogers, Harpending, 1992). Однако в этом случае сеть гаплотипов имела бы более хаотичную структуру. Но даже на основе комбинированных данных получена простая структура с двумя звездообразными гаплогруппами (рисунок 5г). Кроме того, значения показателей *SSD* и *Hri* также были незначительными, что также указывает на рост популяции. С другой стороны, бимодальное распределение графика частот попарных нуклеотидных различий для популяции *M. suifunensis* при наличии двух гаплогрупп в MST, каждая из которых имела звездообразную структуру, не противоречит гипотезе эволюционной экспансии (Marjoram,

Donelly, 1994). На основании данных, полученных для вида *M. suifunensis*, можно сделать предположение, что на стадии своего образования от общего предка, этот вид дал начало двум предковым гаплотипам, филогенетически близким друг другу. Эти гаплотипы развивались независимо друг от друга, но в настоящее время не имеют полной изоляции из-за потока генов.

**3.6. Эпидемиология метагонимоза.** Трематодозы, в том числе метагонимоз, оказывают влияние на здоровье трудоспособного населения и, в конечном счете, способны вызвать экономические потери. Из известных в настоящее время 14 видов данного рода (с учетом данных Nakao et al., 2022) пять видов зарегистрированы как паразиты человека (*M. yokogawai*, *M. takahashii*, *M. minutus*, *M. miyatai*, *M. katsuradai*) (Беспрозванных и др., 2012; Chai et al., 2005; Chai, 2015, Chai, 2017). В настоящее время на территории юга Дальнего Востока циркулируют два вида рода *Metagonimus*. Проведенные в настоящей работе морфологические и генетические исследования показали, что *M. yokogawai* в исследуемом регионе является синонимом *M. suifunensis*, этот вид обнаруживался во всем регионе, до северных границ ареала. На территории Японии, в результате исследования Накао с соавторами (Nakao et al., 2022), затронувшего все крупные острова Японского архипелага, *M. suifunensis* не обнаружен, что говорит о небольшой вероятности его миграции с континентальной части, и свидетельствует о том, что *M. suifunensis* – эндемичный вид, широко распространенный на юге Дальнего Востока России.

Другой эндемичный вид, *M. pusillus* (= *M. katsuradai*), менее распространен. Данный вид также не обнаруживался в Японии, а в Приморском крае *M. pusillus* на данный момент выявлен только бассейне реки Раздольная, из чего возможно предположить, что случаи заражения населения на Дальнем Востоке связаны с *M. suifunensis*, а *M. pusillus* существенного эпидемиологического значения не имеет. Однако для исключения вероятности заражения человека, необходимо провести исследования естественной зараженности промежуточных и окончательных хозяев.

Наиболее часто применяемые методы диагностики метагонимоза (копроовоскопический анализ, серологические тесты, включая ИФА) не позволяют определить видовую принадлежность паразита (Ермоленко и др., 2020). Кроме того, при низкой интенсивности инвазии возможны ложноотрицательные результаты. Также использование этих методов для мониторинга зараженности разных хозяев может вызывать трудности при идентификации видов рода *Metagonimus*. Полученные в настоящей работе данные могут лечь в основу разработки молекулярных диагностикомов, позволяющих достоверно определять паразитов на разных стадиях жизненного цикла, а также выявить возможное наличие других видов на территории юга Дальнего Востока России.

## ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах:

1. Shumenko P.G., Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V. *Metagonimus suifunensis* sp. n. (Trematoda: Heterophyidae) from the Russian Southern Far East: Morphology, life cycle, and molecular data // *Parasitology International*. 2017. Vol. 66. P. 982-991.
2. Tatonova Y.V., Shumenko P.G., Besprozvannykh, V.V. Description of *Metagonimus pusillus* sp. nov. (Trematoda: Heterophyidae): phylogenetic relationships within the genus // *Journal of Helminthology*. 2018. Vol. 92. P. 703-712.
3. Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V., Shumenko P.G., Nguyen H.M., Solodovnik D.A. First description of genetic diversity for the genus *Metagonimus* using the complete *cox1* gene sequences // *International Journal for Parasitology*. 2019. Vol. 49. P. 985-992.
4. Tatonova Y.V., Shumenko P.G. Cytochrome *b* as a more promising marker for analysing the distribution vector for *Metagonimus suifunensis* (Trematoda: Heterophyidae) // *Parasitology*. 2021. Vol 148. P. 760-766.
5. Shumenko P.G., Tatonova Y.V. Assessing the population structure of trematode *Metagonimus suifunensis* using three mitochondrial markers // *Parasitology Research*. 2022. Vol. 121. P. 915-923.

### Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных конференций:

6. Shumenko P.G., Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V. Molecular characterization of *Metagonimus yokogawai* (Trematoda: Heterophyidae) in the Russian southern Far East // МАРЕЕГ. Владивосток, 2015. P. 66.
7. Shumenko P.G., Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V. Genetic diversity of new species *Metagonimus suifunensis* in the Russian Southern Far East // МАРЕЕГ. Владивосток, 2017. P. 39.
8. Шуменко П.Г., Татонова Ю.В., Беспрозванных В.В. Новые представители рода *Metagonimus* (Trematoda: Heterophyidae) юга Дальнего Востока России // Генетика популяций: прогресс и перспективы. Материалы международной научной конференции. Москва, 2017. С. 328.
9. Шуменко П.Г., Татонова Ю.В., Солодовник Д.А., Беспрозванных В.В. Низкая изменчивость полноразмерной последовательности гена *cox1* мтДНК представителя рода *Metagonimus* (Trematoda: Heterophyidae) // Труды Центра паразитологии (сборник материалов Международной научной конференции «Биоразнообразие паразитов»). Москва, 2018. С. 287.
10. Шуменко П.Г., Татонова Ю.В. Генетическое разнообразие *Metagonimus suifunensis* (Trematoda: Heterophyidae) на основе гена *cytb* мтДНК // Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии. Улан-Удэ, 2021. С. 574

ШУМЕНКО  
ПОЛИНА ГЕННАДЬЕВНА

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук