

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ КОПЕПОД *Salmincola* (Copepoda, Siphonostomatoida, Lernaeopodidae): ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СКОРОСТЬ ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМ c-ОКСИДАЗЫ I

© 2023 г. С. В. Шедько¹ *, М. Б. Шедько¹, И. Л. Мирошниченко¹, Г. А. Немкова¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: shedko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Штрихкодированный фрагмент гена *COI* секвенирован у 91 образца пяти видов паразитических копепоид *Salmincola*, снятых с лососевых рыб в основном с Дальнего Востока России (ДВР): *S. californiensis* (микижа и сима) и *S. edwardsii* (различные виды голец, нерка из оз. Кроноцкого), *S. carpionis* (различные виды голец), *S. markewitschi* (кунджа), *S. stellata* (сахалинский таймень). Всего был найден 41 вариант гаплотипов с максимальным уровнем различий 0.183 нуклеотидных замен на позицию. Расстояние между видами варьировало от 0.139 ± 0.014 (в паре *S. markewitschi*–*S. carpionis*) до 0.179 ± 0.015 (в паре *S. stellata*–*S. californiensis*). Внутривидовое нуклеотидное разнообразие фрагмента гена *COI* намного ниже и составило для *S. californiensis* и *S. edwardsii*, населяющих жаберную полость и плавники хозяина – 0.013 ± 0.003 и 0.015 ± 0.003 , а для *S. stellata*, *S. markewitschi* и *S. carpionis*, локализуемых в ротоглоточной полости хозяев – 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 и 0.005 ± 0.001 соответственно. Сравнение выборок трех видов копепоид *Salmincola* из разных районов ДВР выявило существенную ($F_{st} = 0.28–0.42$, $P \ll 0.001$) генетическую подразделенность. Три субклады *edwardsii*-подобных копепоид – *S. edwardsii* с ДВР, *S. edwardsii* с американской ручьевой палии востока Северной Америки и *S. siscowet* с озерной палии штата Мичиган (*COI*-последовательности копепоид из последних двух групп взяты из генетических баз данных) – различались между собой в среднем по 9.3–10.9% нуклеотидных позиций, что указывает на необходимость таксономической ревизии *S. edwardsii*. Согласно проведенному молекулярному датированию дивергенция линий *Salmincola* началась в миоцене и завершилась в раннем плиоцене. Филогенетическая скорость составила 0.023 (95%-ный интервал: 0.013–0.033) нуклеотидных замен на позицию на млн лет на линию. Скорость нуклеотидных замещений на популяционном уровне оказалась в 3.7 раза выше – 0.085 (0.021–0.170). Высокий уровень изменчивости фрагмента гена *COI* делает этот маркер удобным инструментом как для разработки систематики и филогении копепоид *Salmincola* и Lernaeopodidae на видовом и родовом уровнях, так и для анализа дифференциации их популяций.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, систематика, молекулярные часы.

DOI: 10.31857/S0016675823100119, **EDN:** UAJHRE

В настоящее время сравнительный анализ ДНК составляет одну из основ современной систематики. В прошлом молекулярно-генетические данные большей частью привлекались лишь для проверки обоснованности описания новых видов и/или сведения их в синонимы, проведенных систематиками-морфологами. Однако в последние десятилетия из-за неуклонного снижения числа квалифицированных специалистов-морфологов все более и более актуальным становится создание условий для корректной идентификации организмов широким кругом исследователей не только по морфологическим, но и по другим при-

знакам. Сравнительно дешевые и не очень сложные в использовании (часто шаблонные) методы молекулярной систематики могут помочь в решении обозначившейся проблемы.

Копепоиды являются типичными обитателями морских и пресных вод и распространены повсеместно. Две трети из 14 500 известных видов копепоид – свободноживущие, ведут планктонный или бентический образ жизни, либо симбиотические организмы. Остальные известны как паразиты [1]. Семейство Lernaeopodidae с 48 родами и более чем 300 видами относится к их числу [2]. Копепоиды этого семейства являются исключительно па-

разитическими формами, прикрепляющимися к хозяину с помощью уникального якореподобного органа — буллы, вырабатываемой из секрета фронтальной железы [3]. Их фиксация на теле хозяина необратима и привязана к определенному месту (топическая специфичность). Большинство из Lernaеорodidae являются паразитами морских рыб. Пресноводная группа Lernaеорodidae включает в себя семь родов, из которых наиболее известны обитающие на лососевых рыбах (хариусах, сигах и собственно лососях) три рода: *Salmincola* Wilson, 1915 (23 вида), *Coregonicola* Markewitsch, 1936 (3 вида) и *Basanistes* Nordmann, 1832 (4 вида) [2, 4, 5]. Копеподы *Salmincola* являются объектами повышенного интереса в силу их паразитирования на промысловых видах лососевых в природе и в условиях аквакультуры, а также на видах, являющихся объектами спортивного рыболовства, на которых могут оказывать патогенное влияние различной степени и характера [6–12]. Кроме того, интерес вызывает их высокая, как правило, степень специфичности к хозяевам [3–5], что открывает широкие возможности для исследования особенностей и закономерностей сопряженной эволюции хозяев и их паразитов.

Определение видов Lernaеорodidae требует немалого опыта и навыков в препарировании образцов, изготовлении препаратов для микроскопии и их анализе. Необходимым представляется наличие в распоряжении исследователя показательной коллекции препаратов разных видов для сравнения. Именно для подобных случаев разработка систем ДНК-идентификации представляется актуальной задачей. В последние годы такие системы чаще всего выстраиваются на базе анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей так называемого штрихкодowego фрагмента гена субъединицы I цитохром с-оксидазы (cytochrome c oxidase subunit I, *COI*) [13].

Цель настоящей работы — создание основ ДНК-идентификации паразитических копепод рода *Salmincola* путем анализа изменчивости фрагмента гена *COI* у пяти видов этого рода, обитающих на лососевых рыбах Дальнего Востока России, морфологически и экологически достаточно подробно здесь изученных [14–26]: *S. californiensis* (Dana, 1852) — паразита микижи *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792) и пяти видов тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*, локализация на хозяине — жаберная полость, жаберные лепестки, плавники, а также [*O. kisutch* (Walbaum, 1792), *O. nerka* (Walbaum, 1792)] — ротовая полость; *S. edwardsii* (Olsson, 1869) — типичного паразита различных видов гольцов рода *Salvelinus* и, как исключение, жилой формы *O. nerka* оз. Кроноцкое, локализация на хозяине — жаберная полость, реже жаберные лепестки, единично — плавники; *S. carpio* (Krøyer, 1837) — обычного паразита многих видов *Salvelinus*, за исключением кунджи *Salvelinus leucomaenis* (Pal-

las, 1814), локализация — ротоглоточная полость; *S. markewitschi* Shedko et Shedko, 2002 — специфичного для кунджи паразита, локализация — ротоглоточная полость; *S. stellata* Markevich, 1936 — специфичного для сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) паразита, локализация — ротоглоточная полость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего для генетического исследования нами был использован материал от пяти видов *Salmincola* (91 копепода), зафиксированный в 70%-ном спирте, собранный с десяти видов лососевых рыб, отловленных в 15 локалитетах (табл. 1, рис. 1). Все образцы до выделения из них ДНК были идентифицированы до вида по стандартному набору морфологических диагностических признаков [3–5, 15–17]. Суммарную ДНК получали из яйцевых мешков или кусочков туловища копепод солевым способом [27] при использовании протеиназы К.

Амплификацию фрагмента гена субъединицы I цитохром с-оксидазы осуществляли с помощью пары универсальных праймеров LCO1490 и HCO2198 [28], согласно условиям, указанным их разработчиками, в термоблокере Biometra TProfessional (“Biometra”, Германия) в 25 мкл реакционной смеси, включавшей 0.1–0.2 мкг суммарной ДНК, 2.5 мкл буфера (60 мМ трис-НСl, pH 8.5; 1.5 мМ MgCl₂; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0.1%-ный тритон X-100), 0.5 мкл суммы дезокситрифосфатов из 10 мМ раствора, по 2.5 мкл обоих праймеров (“Синтол”, Москва) из их 2 мкМ растворов, 1 единицу активности Taq-полимеразы (“СибЭнзим”, Новосибирск) и деионизированную воду.

Продукты амплификации очищали этаноловым переосаждением и секвенировали с помощью набора Big Dye Terminator версии 3.1 (“Applied Biosystems”, США) при использовании праймеров LCO1490 и HCO2198. Продукты реакции секвенирования разделяли на автоматическом анализаторе ABI Prizm 3130 (“Applied Biosystems”, США/“Hitachi”, Япония) или Нанофор-05 (“Синтол”, Москва) из приборной базы ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток). ABI-хроматограммы собирали в контиги с помощью программ из пакета Staden [29]. Необходимые манипуляции с нуклеотидными последовательностями проводили с помощью пакета программ Seaview [30].

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *COI* длиной 654 пн были депонированы в GenBank под номерами доступа OQ843970–OQ844060.

В дополнение к собственному материалу в работе были использованы 35 последовательностей фрагмента *COI* от копепод *Salmincola*, взятых из

Таблица 1. Число исследованных образцов пяти видов паразитических копепоид рода *Salmincola*, их хозяева, происхождение выборок

SST (n = 10)	Вид копепоиды*				Хозяин**	Код выборки	Место сбора материала	Дата сбора материала	Сборщик
	SMR (n = 26)	SCR (n = 26)	SCL (n = 20)	SED (n = 9)					
8	2	1	6	1	PE	AMG	р. Амгу, Приморье	05.11.2011	Шедько М.Б.
					LE	AMG	р. Амгу, Приморье	05.11.2011	То же
		1			CU	MAK	р. Максимовка, Приморье	26.07.2008	»
			6		MS	MAK	р. Максимовка, Приморье	26.07.2008	»
			2		MS	KUZ	р. Кузнецова, Приморье	02.08.2008	»
				1	LE	KUZ	р. Кузнецова, Приморье	02.08.2008	»
				1	LE	SKH	р. Белая, о. Сахалин	17.07.2018	»
2	18				PE	TUM	р. Тумнин, Хабаровский край	10.09.2012	Миронова Т.Н.
		10			LE	SHA	р. Большой Омокой, о. Большой Шантар	21.08.2010	Шедько С.В.
		3			CU	SHA	р. Большой Омокой, о. Большой Шантар	21.08.2010	То же
		3			CU	SHA	р. Большой Анаур, о. Большой Шантар	12.08.2010	»
					CU	SHA	оз. Лисье, о. Феклистова	20.08.2010	»
			3		MY	SHA	р. Оленья, о. Большой Шантар	23.08.2010	»
	1				LE	AZA	оз. Азабачье, Камчатка	21.07.2014	Шедько М.Б.
	3				LE	AZA	оз. Азабачье, Камчатка	11.10.2022	Паренский В.А.
		5			AB	RAD	р. Радуга, Камчатка	20.07.2014	Шедько М.Б.
			4		MY	AZA	оз. Азабачье, Камчатка	26.08.2007	Паренский В.А.
			3		MY	RAD	р. Радуга, Камчатка	21.08.2007	Паренский В.А.
				1	MA	AZA	оз. Азабачье, Камчатка	21.07.2014	Шедько М.Б.
				4	NE	KRO	оз. Кроноцкое, Камчатка	13.08.2011	Соколов С.Г.
				2	SH	KRO	оз. Кроноцкое, Камчатка	05.08.2011	То же
	2				LE	UTK	р. Утхолок, Камчатка	22.09.2007	»
		3			MA	UTK	р. Утхолок, Камчатка	22.09.2007	»
			2		MY	UTK	р. Утхолок, Камчатка	22.09.2007	»
		1			AL	GRL	о. Диско, Гренландия	06.09.2006	Jørgensen T.R.

Примечание. * SST – *Salmincola stellata*; SMR – *S. markewitschi*; SCR – *S. carpinis*; SCL – *S. californiensis*; SED – *S. edwardsii*. ** AL – *Salvelinus alpinus*; AB – *S. albus* Glubokovsky, 1977; CU – *S. curilus*; LE – *S. leucomaenis*; MA – *S. malma* (Walbaum, 1792); SH – *S. schmidtii* Viktorovsky, 1978; MS – *Oncorhynchus masou*; NE – *O. nerka*; MY – *Parasalmo mykiss*; PE – *Parahucho perryi*.

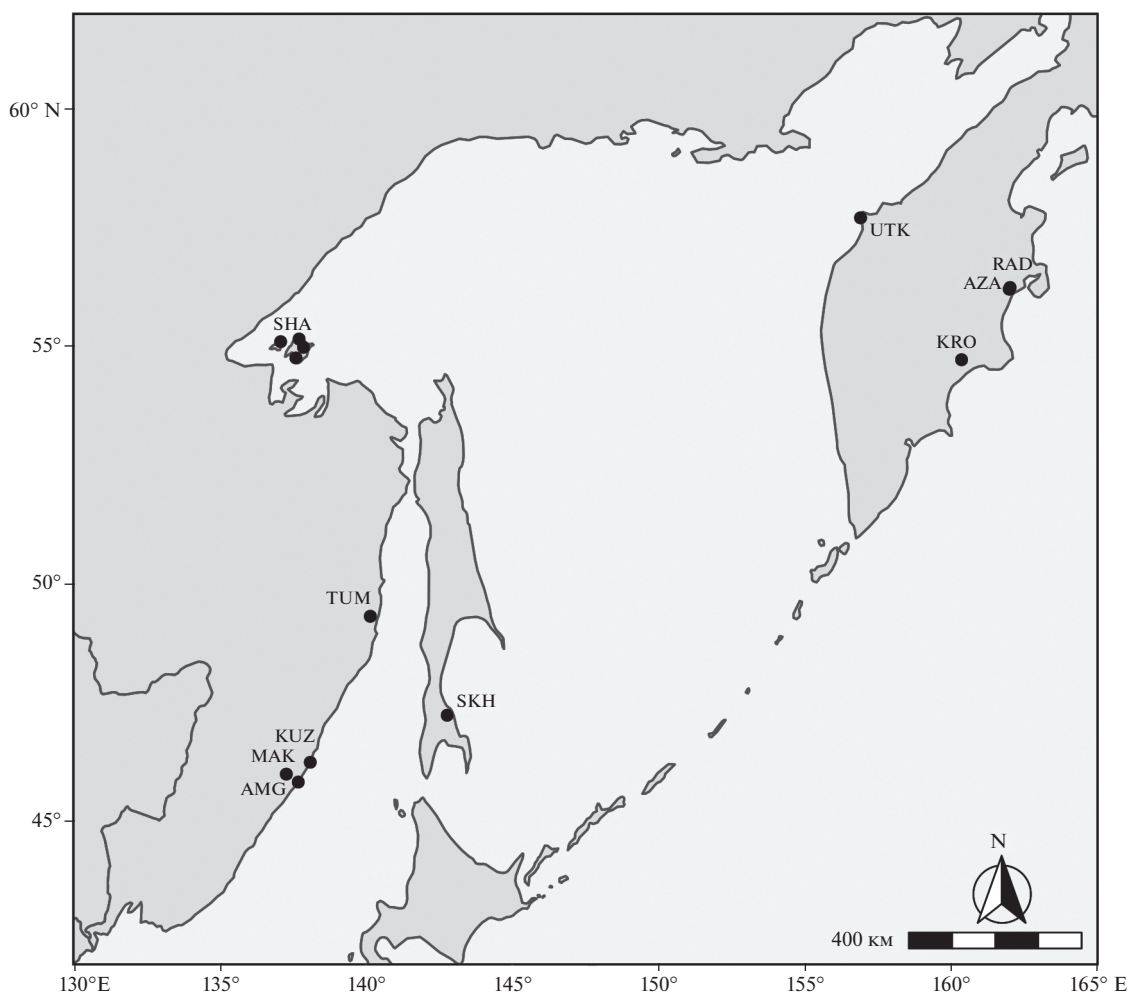


Рис. 1. Географическое расположение выборок копепод *Salmincola* с Дальнего Востока России. Код выборки см. табл. 1.

GenBank ($n = 12$) и публичного портала базы BOLD [13] ($n = 23$). Эти образцы были сняты с трех видов лососевых рыб — кунджи (GenBank: LC713314–LC713325), озерной палии *Salvelinus namaycush* (Walbaum, 1792) (BOLD: ZOOPS448-19–OOPS451-19), американской ручьевой палии *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814) (GenBank: OQ355023–OQ355029, BOLD: ZOOPS266-19–ZOOPS270-19), а также одного вида из форелевого хозяйства — микижи (BOLD: ZOOPS117-18, ZOOPS118-18, ZOOPS442-19–ZOOPS446-19). Копеподы с этих хозяев значатся в вышеуказанных генетических базах данных как *S. cf. markewitschi*, *S. siscowet* (Smith, 1874), *S. edwardsii* и *S. californiensis*. Вместе с дополнительным материалом размерность итоговой матрицы данных составила 126 последовательностей на 654 нуклеотидные позиции.

Филогенетическое дерево строили методом максимального правдоподобия (ML) с помощью программы IQ-TREE v. 2.2 [31, 32] при использовании оптимальных моделей нуклеотидных замеще-

ний (TN + F + I и K3Pu + F + G4), подобранных в указанной программе для двух подразделений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI*: 1) первой и второй, а также 2) третьей позиции кодонов. Устойчивость ветвлений ML-дерева оценивалась в 2000 псевдослучайных репликах быстрого [33] бутстрепа.

Молекулярное датирование филогении проведено в рамках байесовского подхода с помощью пакета программ BEAST 1.8.4 [34] при следующих условиях: акты видообразования — в соответствии с распределением Юла (использованы не все 126 последовательностей, а двенадцать, характеризующих основные клады *Salmincola*); модель молекулярных часов — одна и та же скорость нуклеотидных замен для разных ветвей дерева (различие между оценками правдоподобия, полученными для аддитивного и ультраметрического ML-деревьев, оказалось статистически не значимым: $\Delta \ln L = 7.14$, $P = 0.16$; расчеты проводились в программе PAUP 4.0 [35] — команда “clockChecker”); модель

Таблица 2. Межрегиональная дифференциация копепод *Salmincola* по фрагменту гена *COI*

Вид/Регион	Нуклеотидное разнообразие (<i>p</i> -расстояние)	Нетто-расстояние* между выборками	<i>F</i> -статистика** (<i>P</i>)
<i>S. markewitschi</i>			
Шантары (<i>n</i> = 18)	0.0006 ± 0.0005	0.0010 ± 0.0006	0.42 (0.0003)
Камчатка (<i>n</i> = 6)	0.0066 ± 0.0020		
<i>S. carpionis</i>			
Шантары (<i>n</i> = 17)	0.0013 ± 0.0008	0.0022 ± 0.0009	0.28 (0.0003)
Камчатка (<i>n</i> = 7)	0.0064 ± 0.0020		
<i>S. californiensis</i>			
Приморье (<i>n</i> = 8)	0.0053 ± 0.0014	0.0073 ± 0.0026	0.36 (0.0000)
Камчатка (<i>n</i> = 9)	0.0124 ± 0.0022		

Примечание. * — уравнение 10.21 в [36], расстояние рассчитано в программе SENDBS [37]; ** — получена исходя из частот гаплотипов по результатам AMOVA в программе Arlequine v. 3.5.2.2 [38].

нуклеотидных замещений для подразделений матрицы данных — TN + F + I и TN + F + G4 (использована вместо K3Pu + F + G4); протяженность байесовского анализа — 300 000 000 циклов с отбором каждого двухтысячного шага и отжигом первых 30% шагов. Для привязки ультраметрического дерева к абсолютной шкале времени было использовано два калибровочных интервала (см. ниже). Эффективный размер выборок (Effective Sample Size, ESS) для всех контролируемых параметров байесовского анализа был 2000 и более. С целью проверки результатов на воспроизводимость анализ проводился в нескольких повторениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего у девяноста одной исследованной нами копеподы был выявлен 41 вариант различающихся гаплотипов фрагмента гена *COI* с максимальным уровнем попарных различий 0.183 нуклеотидных замен на позицию (*p*-расстояние). На ML-дереве эти гаплотипы сформировали пять высоко дифференцированных клад, соответствующих пяти рассматриваемым видам (рис. 2). Средние расстояния между членами этих клад варьировали от 0.139 ± 0.014 в паре *S. markewitschi*—*S. carpionis* до 0.179 ± 0.015 в паре *S. stellata*—*S. californiensis*. Внутривидовое нуклеотидное разнообразие фрагмента гена *COI* оказалось намного ниже и составило 0.013 ± 0.003 и 0.015 ± 0.003 для *S. californiensis* и *S. edwardsii*. Эти два вида паразитических копепод населяют жаберную полость, жаберные лепестки и плавники хозяина. У видов, локализующихся в ротоглоточной полости хозяев, оценки нуклеотидного разнообразия составили еще меньшие величины — 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 и 0.005 ± 0.001 для *S. stellata*, *S. markewitschi* и *S. carpionis* соответственно.

Сравнение трех пар выборок копепод *Salmincola* из разных районов Дальнего Востока России выявило существенные межрегиональные отличия по составу гаплотипов, проявляющиеся в умеренно высоких значениях *F*-статистики (табл. 2). Дисперсионный анализ, проведенный на основе рассмотрения попарных нуклеотидных различий, привел к практически тем же результатам — *F*-статистика варьировала в интервале 0.41–0.44 ($P = 0.000$ – 0.001). Нетто-расстояние между выборками *S. californiensis* заметно больше расстояний между выборками двух других видов. Это может быть вызвано тем, что выборки *S. californiensis* были получены не с одного, а с двух разных хозяйев — микижи (Камчатка) и симы *Oncorhynchus masou* (Brevoort, 1856) (Приморье). Любопытно, что для всех трех видов *Salmincola* наибольшее нуклеотидное разнообразие наблюдалось в выборках, собранных на Камчатке (табл. 2).

Гаплотип фрагмента гена *COI*, выявленный у копеподы *S. carpionis*, собранной с арктического гольца *Salvelinus alpinus* (L.) о-ва Диско, расположенного неподалеку от побережья Гренландии ($69^{\circ}28'59.2''$ N $53^{\circ}56'45.6''$ W), мало чем отличался от гаплотипов этой копеподы, собранных с различных видов гольцов *Salvelinus* на Дальнем Востоке России. Наибольшее сходство с ним демонстрировал гаплотип, найденный у южной мальмы *Salvelinus curilus* (Pallas, 1864) с Шантарских о-вов — $p = 0.009$. Столь малые различия образцов, собранных из мест, удаленных друг от друга на более чем 6000 км, свидетельствуют о сравнительной молодости современного ареала *S. carpionis*.

Последовательности фрагмента гена *COI*, обнаруженные у копепод, снятых с кунджи Японских островов, вошли в состав клад копеподы *S. markewitschi* (рис. 2). Это подтверждает правильность включения о-вов Хоккайдо и Хонсю в ареал данного вида [24–26]. Последовательности

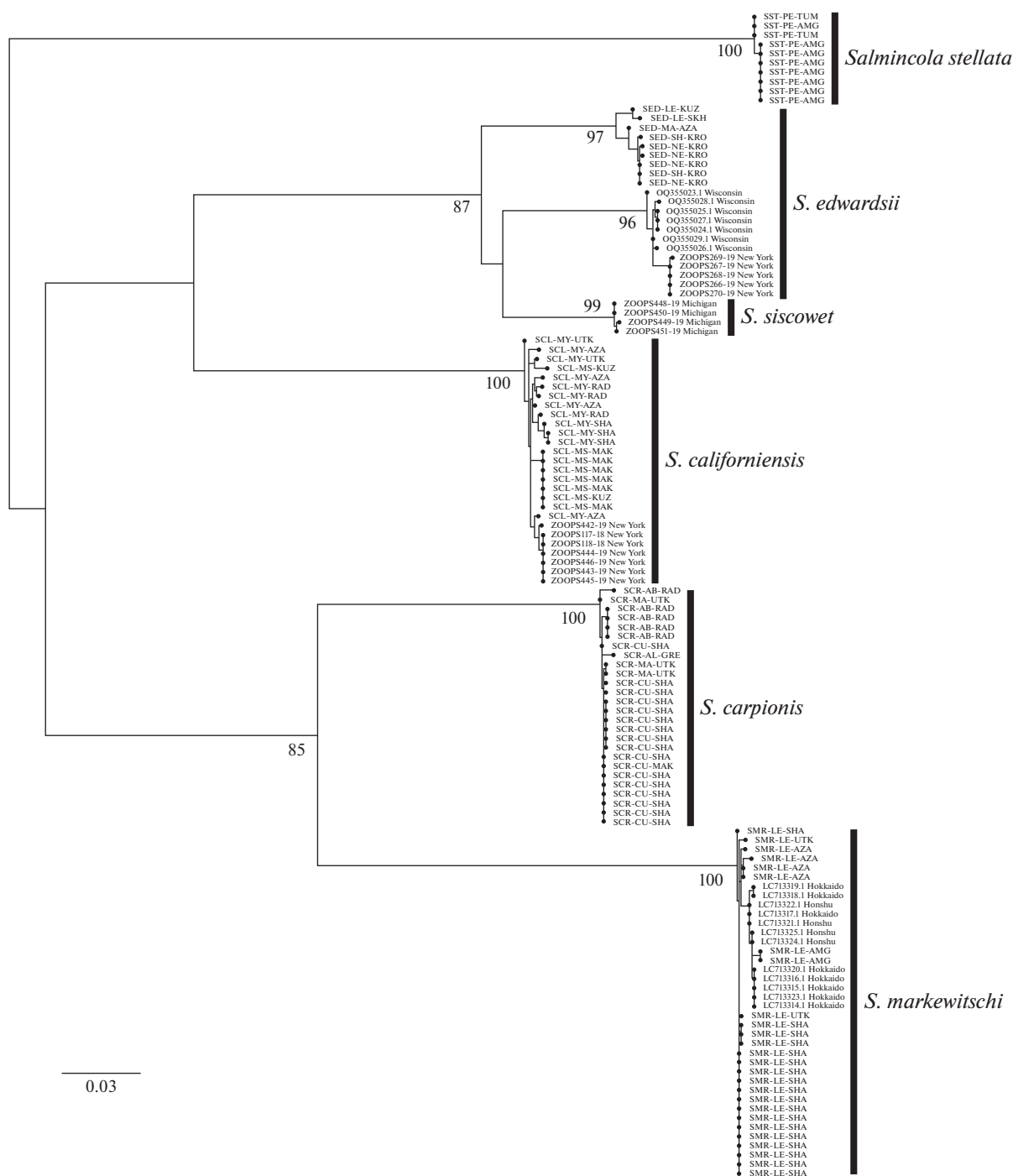


Рис. 2. Оптимальное ML-дерево ($\ln L = -2971.66$), построенное для фрагмента гена *COI* копепод *Salmincola*, укорененное по срединной точке. Цифры у основания клад – оценки бутстреп-поддержки (в % от 2000 циклов, показаны только для основных клад и только превышающие уровень 70%); название последовательностей, полученных в настоящей работе, складывается из кода названия вида, кода хозяина и места взятия материала (см. табл. 1); для остальных последовательностей даны номера доступа GenBank или BOLD.

COI, выявленные у копеподы *S. californiensis* от микижи из форелевого хозяйства в штате Нью-Йорк, оказались мало отличимы от одного из гаплотипов *S. californiensis*, найденного у микижи оз. Азабачьего.

Кладу *edwardsii*-подобных копепод сложили три хорошо выраженные субклады последовательностей фрагмента гена *COI*, различающиеся в среднем по 0.093–0.109 нуклеотидных позиций. Это 1) образцы *S. edwardsii* с нескольких видов

гольцов *Salvelinus* с Дальнего Востока России и нерки оз. Кроноцкого, 2) образцы *S. edwardsii* с восточного побережья Северной Америки, снятые с американской палии *S. fontinalis* и 3) *S. sis-cowet* с озерной палии *S. namaycush* из штата Мичиган. Столь высокие различия последовательностей фрагмента гена *COI* между этими субкладами указывают на необходимость ревизии вида, известного в настоящее время как *S. edwardsii* и имеющего циркумполярное распространение в Голарктике. В прошлом [4] в синонимы к *S. edwardsii* были сведены несколько номинальных видов, которые после повторного исследования их морфологии вполне могут оказаться самостоятельными видами. В частности, ранее были отмечены некоторые отличия азиатских *S. edwardsii* от североамериканских [4, 16].

Датировка дерева *Salmincola* основывалась на факте высокой степени специфичности этих паразитов [3–5, 16–26], что позволило принять допущение о том, что диверсификация *Salmincola* в целом повторяла диверсификацию линий их хозяев и происходила без существенного лага во времени.

В каркас молекулярного датирования филогении *Salmincola* была положена хронограмма филогенетического дерева Salmonidae, полученная нами ранее, исходя из анализа полных и частичных митогеномов [39]. Для датировки использовались два калибровочных интервала — вероятный возраст кроны всего дерева *Salmincola* и возраст кроны группы видов *edwardsii*-подобных копепоид. В качестве априорной вероятности (приора) возраста кроны всего дерева *Salmincola* было взято смещенное логнормальное распределение: логарифм средней равен 1.0, логарифм стандартного отклонения — 0.72, смещение — 19. Это в результате устанавливало 5% и 95%-ный квантили возраста кроны *Salmincola* в двадцать (примерное время завершения обособления следующих линий хозяев копепоид *Salmincola* — *Parahucho*, *Salvelinus*, *Parasalmo* и *Oncorhynchus* [39]) и двадцать восемь (примерный возраст линии Salmoninae, включающей в себя *Salmo*, *Salmothymus*, *Parahucho*, *Salvelinus*, *Parasalmo* и *Oncorhynchus* [39]) млн лет соответственно. Приор возраста кроны группы видов *edwardsii*-подобных копепоид был принят аналогичным образом: логарифм средней — 1.7, логарифм стандартного отклонения — 0.7, смещение — 2.5. Это в результате давало 5% и 95%-ный квантили возраста кроны группы видов *edwardsii* в четыре (примерное время завершения обособления основных линий в кроне *Salvelinus*: *S. fontinalis*; *S. leucomaenis*; *S. levanidovi* Chereshev, Skopets et Gudkov, 1989; *S. namaycush*; а также линии, включающей в себя альпиноидных и мальмоидных гольцов [39]) и двадцать (примерный возраст ствола *Salvelinus* [39]) млн лет соответственно.

Необходимо указать на то, что в некоторых работах по датированию филогении Salmonidae ([40], к примеру) можно встретить несколько большие оценки возраста ветвлений в кладах тихоокеанских лососей и форелей, а также гольцов, чем те, которым мы следовали [39]. По нашему мнению, причина различий заключается в некорректной оценке возраста опорных ветвлений в этой части дерева Salmonidae. Возраст ископаемого *Smilodonichthys rastrosus* Cavender et Miller, 1972 был интерпретирован как возраст кроны линии тихоокеанских лососей и форелей, а возраст ископаемого *Oncorhynchus ketopsis* Eiting et Smith, 2007 — как время, прошедшее с момента дивергенции *O. keta* (Walbaum, 1792) и *O. gorbuscha* (Walbaum, 1792) [40].

Некоторые характеристики *Smilodonichthys* указывают на его близость к линии тихоокеанских лососей и форелей [41]. Однако строение челюстей, а также жаберного аппарата исключает возможность объединения этого ископаемого вида в одну кладу [40] с видами *O. masou*, *O. keta* и *O. gorbuscha*. Соответственно, возраст *Smilodonichthys* может использоваться лишь как оценка возраста ствола тихоокеанских лососей и форелей.

Oncorhynchus ketopsis морфологически сходен с видами *Oncorhynchus*, но включение его в одну кладу вместе с *O. keta* и *O. gorbuscha* [40] не обосновано. Ископаемый вид отличается от указанных и других видов *Oncorhynchus* строением жаберного аппарата ([42]: 421). Поэтому возраст *O. ketopsis* может использоваться лишь в качестве оценки возраста кроны тихоокеанских лососей в целом. Наш вариант молекулярной датировки этой части дерева Salmonidae [39] учитывает оба этих обстоятельства.

Результат молекулярного датирования филогении видов *Salmincola* приведен на рис. 3. Согласно данной хронограмме, дивергенция линий *Salmincola* произошла в миоцене и завершилась в раннем плиоцене. Интересная ситуация складывается относительно возраста линий двух специфичных для гольцов паразитических копепоид — *S. carpinis* и *S. markewitschi*. Первый из этих видов является специфическим для рода *Salvelinus* и обитает на широком круге хозяев — прежде всего на разных видах гольцов из альпиноидной и мальмоидной групп. У кунджи этот вид не найден [16, 18–20]. Второй вид копепоид является специфичным на уровне вида и известен только с кунджи [16, 24–26]. Из рис. 3 можно видеть, что возраст линии *S. markewitschi* составляет около 11.6 млн лет. Это заметно больше возраста линии ее хозяина кунджи — порядка 6 (4.1–8.2) млн лет [39]. Это противоречие можно объяснить тем, что линия *S. markewitschi* изначально обитала на каком-то из вымерших к настоящему времени видов гольцов.

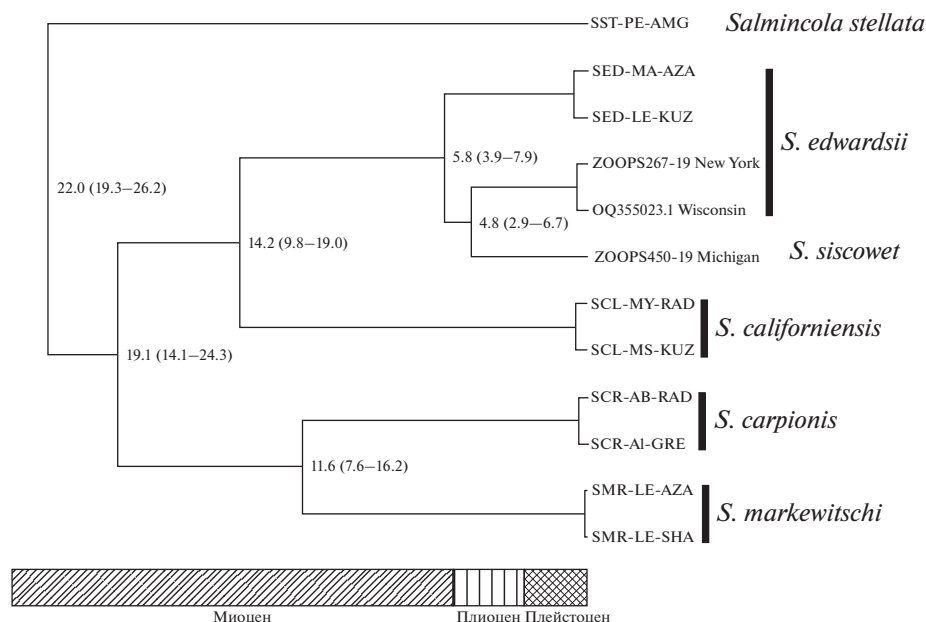


Рис. 3. Байесовская хронограмма филогении копепод *Salmincola*, построенная на основе анализа фрагмента гена *COI*. Цифры — эволюционный возраст в млн лет (в скобках — 95%-ные интервалы наивысшей апостериорной плотности).

Ее вселение на кунджу, видимо, произошло позднее, после возникновения этого вида гольцов.

Полученная по результатам байесовского датирования оценка скорости эволюции фрагмента гена *COI* у *Salmincola* оказалась равной 0.0228 ± 0.0052 (95%-ный интервал наивысшей апостериорной плотности HPD: 0.0132–0.033) замен на млн лет на линию (в % различий на млн лет: 4.56 ± 1.01). Без разбиения матрицы данных на два подразделения (в этом случае, оптимальная модель — HKY + F + I + G4) этот показатель составил 0.0250 ± 0.0014 (95%-ный интервал HPD: 0.0137–0.038). Эти оценки близки к нижней границе оценок скорости эволюции фрагмента гена *COI*, рассчитанных при использовании модели TN93 + G для различных групп морских беспозвоночных: 0.022–0.023 (Mollusca) и 0.036–0.043 (Arthropoda) замен на позицию на млн лет на линию [43].

Известно, что оценки скорости эволюции мтДНК, полученные при рассмотрении родословных внутри популяции, отличаются от оценок, рассчитанных для давно разделившихся видов [44]. Поэтому используемая калибровка скорости эволюции должна, по возможности, находиться в соответствии с масштабом времени исследуемых процессов. Для решения этой задачи применительно к *Salmincola* нами были использованы данные, полученные для *S. edwardsii* из оз. Кроноцкого. Аналогично тому, как это было сделано ранее для гольцов *Salvelinus* [45], скорость нуклеотидных замен фрагмента гена *COI* у копепод была рассчитана, исходя из накопленных с момента изоляции нуклеотидных замен [46]. Допуская,

что наиболее часто представленный гаплотип является предковым, были подсчитаны отличия остальных (производных) гаплотипов с учетом частот их встречаемости. Таким образом была получена оценка среднего числа накопленных нуклеотидных различий в расчете на ген — $\rho = 0.667$. Доверительный интервал показателя ρ (95%: 0.167–1.333) был установлен в 500 циклах бутстрэпа, произведенных с помощью пакета boot [47]. Деление значения ρ на длину фрагмента *COI* и время изоляции лососевых рыб, обитающих в оз. Кроноцкое (12000 лет [48, 49]), дало искомую оценку скорости нуклеотидных замещений на уровне родословных внутри популяции $\mu = 0.0849$ (95%-ный интервал HPD: 0.0212–0.170) замен на позицию на млн лет на линию. Полученная оценка практически идентична той, что установлена для гена *COI* одного из видов изопод (Crustacea) при исследовании популяции, сформировавшейся менее 10000 лет назад — 0.087 (95%-ный доверительный интервал: 0.042–0.12) [50]. Несколько меньшая скорость эволюции *COI* была вычислена для креветки *Haptosquilla* (Crustacea) при рассмотрении временного отрезка менее 20000 лет — 0.066 (0.021–0.118) [51].

Применив к нетто-расстояниям из табл. 2 оценку скорости нуклеотидных замещений на уровне родословных (μ), можно найти, что первые две из перечисленных в табл. 2 пары популяций разделились в голоценовое время — 5800–13000 лет назад, а последняя несколько раньше — порядка 43000 лет назад.

В заключение подчеркнем, что установленная сравнительно высокая изменчивость фрагмента митохондриального гена *COI* делает этот маркер удобным инструментом как для разработки систематики и филогении копепод *Salmincola* и *Lernaeopodidae* на видовом и родовом уровнях, так и для анализа дифференциации их популяций. Исследования копепод *Salmincola* позволят восстановить историю и характер взаимоотношений этих паразитов и их хозяев — лососевых рыб *Salmonidae*. Если в отношении хозяев необходимый филогенетический каркас можно признать уже существующим, то для построения обоснованной филогении паразитических копепод *Salmincola* (как и *Lernaeopodidae* в целом) предстоит потратить еще немало усилий. Хочется надеяться, что наша работа поможет исследователям сориентироваться в подборе адекватного набора филогенетических маркеров.

Авторы глубоко признательны С.Г. Соколову, В.А. Паренскому, Т.Н. Мироновой и Т.Р. Jörgsen за предоставленные образцы копепод. Результаты получены с использованием оборудования ЦКП “Дальневосточный вычислительный ресурс” ИАПУ ДВО РАН (<https://www.dvo.ru>).

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernot J.P., Boxshall G.A., Crandall K.A. A synthesis tree of the Copepoda: Integrating phylogenetic and taxonomic data reveals multiple origins of parasitism // *Peer J*. 2021. V. 9. e12034. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12034/SUPP-2>
2. Walter T.C., Boxshall G. World of Copepods Database. *Lernaeopodidae* Milne Edwards, 1840. 2023. World Register of Marine Species. Просмотрено 12.04.2023. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=135525>
3. Kabata Z. Parasitic Copepoda of British Fishes. London: The Ray Society, 1979. V. 152. 468 p.
4. Kabata Z. Revision of the genus *Salmincola* Wilson, 1915 (Copepoda: Lernaeopodidae) // *J. Fish. Res. Board Can.* 1969. V. 26. P. 2987–3041. <https://doi.org/10.1139/z86-276>
5. Kabata Z. Copepoda and Branchiura // *Guide to the Parasites of Fishes of Canada. Part II. Crustacea* / Eds Margolis L., Kabata Z. Ottawa: Dept. Fisheries and Oceans, 1988. P. 3–128.
6. Hare G.M., Frantsi C. Abundance and potential pathology of parasites infecting salmonids in Canadian Maritime hatcheries // *J. Fish. Res. Board Can.* 1974. V. 31. P. 1031–1036. <https://doi.org/10.1139/f74-11>
7. Bell G.R., Margolis L. The fish health program and the occurrence of fish diseases in the Pacific region of Canada // *Fish Pathology*. 1976. V. 10. № 2. P. 115–122. <https://doi.org/10.3147/jsfp.10.115>
8. Kabata Z., Cousens B. Host-parasite relationships sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *Salmincola californiensis* (Copepoda: Lernaeopodidae) // *J. Fish. Res. Board Can.* 1977. V. 34. P. 191–202. <https://doi.org/10.1139/f77-02>
9. Johnson K.A., Heindel J.A. Efficacy of manual removal and ivermectin gavage for control of *Salmincola californiensis* (Wilson) infestation of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), captive broodstocks // *J. Fish Diseases*. 2001. V. 24. P. 197–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00279.x>
10. Roberts R.J., Johnson K.A., Casten M.T. Control of *Salmincola californiensis* (Copepoda: Lernaeopodidae) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): A clinical and histopathological study // *J. Fish Diseases*. 2004. V. 27. P. 73–79.
11. Piasecki W., Goodwin A.E., Eiras J.C., Nowak B.F. Importance of Copepoda in freshwater aquaculture // *Zool. Studies*. 2004. V. 43. № 2. P. 193–205.
12. Mitro M. Brook trout, brown trout, and ectoparasitic copepods *Salmincola edwardsii*: Species interactions as a proximate cause of brook trout loss under changing environmental conditions // *Transactions of the Am. Fisheries Society*. 2016. V. 145. № 6. P. 1223–1233. <https://doi.org/10.1080/00028487.2016.1219676>
13. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>) // *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7. № 3. P. 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
14. Маркевич А.П. Паразитические веслоногие рыб СССР. Киев: Изд-во АН УССР, 1956. 260 с.
15. Гусев А.В. Тип Членистоногие — Arthropoda // *Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 3. Паразитические многоклеточные (Вторая часть)*. Л.: Наука, 1987. С. 378–524.
16. Шедько М.Б., Шедько С.В. О паразитических копеподах рода *Salmincola* (Lernaeopodidae) от дальневосточных гольцов *Salvelinus* (Salmonidae) с описанием нового вида *Salmincola markewitschi* sp. n. // *Зоол. журн.* 2002. Т. 81. № 2. С. 141–153.
17. Шедько М.Б., Шедько С.В. Распространение и морфология *Salmincola stellatus* (Copepoda: Lernaeopodidae) от сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Salmonidae) из Приморья // *Паразитология*. 2003. Т. 37. Вып. 1. С. 60–68.
18. Шедько М.Б. Фауна паразитических копепод рода *Salmincola* (Lernaeopodidae) рыб Камчатки // *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Доклады V научной конф. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2005. С. 128–139.*
19. Шедько М.Б., Поспехов В.В., Атрашкевич Г.И. Новые данные по фауне пресноводных паразитических копепод рода *Salmincola* (Copepoda: Lernaeopodidae) рыб северо-западной части побережья Охот-

- ского моря // Чтения памяти В.Я. Леванидова. Вып. 3. Владивосток: Дальнаука, 2005. С. 421–434.
20. Шедько М.Б., Шедько С.В., Виноградов С.А. Фауна пресноводных паразитических копепоид семейства Lernaeopodidae (Crustacea: Copepoda) рыб острова Сахалин // Растительный и животный мир острова Сахалин (Материалы Международного сахалинского проекта). Часть 2. Владивосток: Дальнаука, 2005. С. 52–63.
 21. Соколов С.Г., Шедько М.Б., Протасова Е.Н., Фролов Е.В. Паразиты рыб внутренних водоемов острова Сахалин // Растительный и животный мир островов северо-западной части Тихого океана (Матер. Междунар. Курильского и Междунар. сахалинского проектов). Владивосток: Дальнаука, 2012. С. 179–216.
 22. Kabata Z. Redescriptions of and comments on four little-known Lernaeopodidae (Crustacea: Copepoda) // Can. J. Zool. 1986. V. 64. P. 1852–1859. <https://doi.org/10.1139/z86-276>
 23. Nagasawa K., Urawa S. New records of the parasitic copepod *Salmincola stellatus* from Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) in Hokkaido, with a note on its attachment site // Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery. 1991. V. 45. P. 57–59.
 24. Nagasawa K. *Salmincola markewitschi* (Copepoda: Lernaeopodidae) parasitic on whitespotted char, *Salvelinus leucomaenis*, in a mountain stream of Honshu Island, Central Japan // Species Divers. 2020. V. 25. № 2. P. 369–375. <https://doi.org/10.12782/specdiv.25.369>
 25. Nagasawa K. Two Copepods *Salmincola edwardsii* and *Salmincola markewitschi* (Lernaeopodidae) parasitic on chars (*Salvelinus* spp.) reared in a salmon museum, Northern Japan // Species Divers. 2021. V. 26. № 2. P. 137–143. <https://doi.org/10.12782/specdiv.26.137>
 26. Nagasawa K., Urawa S. Occurrence of *Salmincola edwardsii* (Olsson, 1869) and *Salmincola markewitschi* Shedko & Shedko, 2002 (Copepoda: Lernaeopodidae) on stream-dwelling salmonids in eastern Hokkaido, Japan, with observations on the morphology of the copepods // Crustac. Res. 2022. V. 51. P. 91–101. https://doi.org/10.18353/crustacea.51.0_91
 27. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
 28. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. № 5. P. 294–299.
 29. Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden Package, 1998 // Bioinform. Methods Protoc. 2000. V. 132. P. 115–130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
 30. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. № 2. P. 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
 31. Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. № 1. P. 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 32. Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices // Syst. Biol. 2016. V. 65. № 6. P. 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>
 33. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 2. P. 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
 34. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
 35. Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4.0. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc., 2002.
 36. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
 37. Nei M., Jin L. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations // Mol. Biol. Evol. 1989. V. 6. № 3. P. 240–300. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040547>
 38. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
 39. Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. Филогения лососевых рыб (Salmoniformes: Salmonidae) и ее молекулярная датировка: анализ мтДНК-данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 718–734. <https://doi.org/10.7868/S0016675813060118>
 40. Lecaudey L.A., Schlieven U.K., Osinov A.G. et al. Molecular phylogenetics and evolution inferring phylogenetic structure, hybridization and divergence times within Salmoninae (Teleostei: Salmonidae) using RAD-sequencing // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 124. P. 82–99. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.022>
 41. Cavender T.M., Miller R.R. *Smilodonichthys rastrousus*, a new Pliocene salmonid fish from western United States // Bull. of the Oregon Museum of Natural History. 1972. V. 18. P. 1–44.
 42. Eiting T.P., Smith G.R. Miocene salmon (*Oncorhynchus*) from Western North America: Gill Raker evolution correlated with plankton productivity in the Eastern Pacific // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2007. V. 249. № 3–4. P. 412–424. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.02.011>
 43. Loeza-Quintana T., Carr C.M., Khan T. et al. Recalibrating the molecular clock for Arctic marine invertebrates based on DNA barcodes // Genome. 2019. V. 62. № 3. P. 200–216. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0107>
 44. Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J. Time dependency of molecular rate estimates and sys-

- tematic overestimation of recent divergence times // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 7. P. 1561–1568. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi145>
45. Шедько С.В. Скорость эволюции митохондриального гена цитохрома *b* согласно анализу недавней (около 12000 лет) изоляции гольцов *Salvelinus* озера Кроноцкое // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 12. С. 1466–1470. <https://doi.org/10.1134/S0016675819090157>
 46. Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H.-J. Origin and evolution of native american mtDNA variation: A reappraisal // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. № 4. P. 935–945.
 47. Canty A., Ripley B. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-20. 2017. 117 p.
 48. Мелекесцев И.В., Брайцева О.А., Эрлих Э.Н., Кожемяка Н.Н. Вулканические горы и равнины // Исто-
рия развития рельефа Сибири и Дальнего Востока. Камчатка, Курильские и Командорские острова. М.: Наука, 1974. С. 162–233.
 49. Гущенко И.И. Вулкан Кроноцкий // Действующие вулканы Камчатки. М.: Наука, 1991. Т. 2. С. 52–61.
 50. Harigai W., Saito A., Suzuki H., Yamamoto M. Genetic diversity of *Ligidium* isopods in Hokkaido and Niigata, Northern Japan, based on mitochondrial DNA analysis // *Zoolog. Sci.* 2020. V. 37. № 5. P. 417–428. <https://doi.org/10.2108/zs200017>
 51. Crandall E.D., Sbrocco E.J., De Boer T.S. et al. Expansion dating: Calibrating molecular clocks in marine species from expansions onto the Sunda Shelf following the last glacial maximum // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29. № 2. P. 707–719. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR227>

DNA Identification of Parasitic Copepods *Salmincola* (Copepoda, Siphonostomatoida, Lernaepodidae): Variability and Rate of Evolution of the Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I Gene

S. V. Shedko^{a, *}, M. B. Shedko^a, I. L. Miroshnichenko^a, and G. A. Nemkova^a

^a*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

^{*}*e-mail: shedko@biosoil.ru*

The barcode fragment of the *COI* gene was sequenced in 91 specimens of five species of parasitic *Salmincola* copepods, sampled from salmonids mainly from the Russian Far East: *S. californiensis* (mykiss and masu salmon) and *S. edwardsii* (various species of chars, sockeye salmon from Lake Kronotskoe), *S. carpinis* (various species of chars), *S. markewitschi* (whitespotted char), *S. stellata* (Sakhalin taimen). A total of 41 haplotypes were found with a maximum level of differences of 0.183 nucleotide substitutions per position. The distance between species varied from 0.139 ± 0.014 in the *S. markewitschi*–*S. carpinis* pair to 0.179 ± 0.015 in the *S. stellata*–*S. californiensis* pair. The intraspecific nucleotide diversity of the *COI* gene fragment is much lower: for *S. californiensis* and *S. edwardsii*, inhabiting the gill cavity and fins of the host – 0.013 ± 0.003 and 0.015 ± 0.003 , and for *S. stellata*, *S. markewitschi*, and *S. carpinis*, localized in the buccal cavity of the hosts – 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 , and 0.005 ± 0.001 , respectively. A comparison of samples of three *Salmincola* copepod species from different regions of the Russian Far East revealed a significant ($F_{st} = 0.28–0.42$, $P \ll 0.001$) genetic subdivision. Three subclades of *edwardsii*-like copepods – *S. edwardsii* from the Russian Far East, *S. edwardsii* from the American brook char of eastern North America, and *S. siscowet* from the lake char of Michigan (*COI* sequences of copepods from the last two groups are taken from genetic databases) – differed from each other by an average of 9.3–10.9% nucleotide positions, which means the need for a taxonomic revision of *S. edwardsii*. According to the molecular dating carried out, the divergence of *Salmincola* lineages started in the Miocene and ended in the early Pliocene. The phylogenetic substitution rate was 0.0228 (95% interval: 0.0132–0.033) nucleotide substitutions/position/million years/lineage. The rate of nucleotide substitutions at the population level is 3.7 times higher – 0.0849 (0.0212–0.170). The high level of variability of the *COI* gene fragment makes this marker a useful tool both for developing the taxonomy and phylogeny of *Salmincola* and Lernaepodidae copepods at the species and genus levels, and for analyzing the differentiation of their populations.

Keywords: mitochondrial DNA, molecular systematics, molecular clock.