

Кремнев Георгий Артурович

**Жизненные циклы, филогения и эволюция трематод семейств
Acanthocolpidae и Brachycladiidae (Digenea: Brachycladioidea)**

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Зоологический институт Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук **Крупенко Дарья Юрьевна**

Официальные оппоненты:

Токарев Юрий Сергеевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», заместитель директора по научной работе

Атопкин Дмитрий Матвеевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Защита состоится 29 октября 2024 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.026.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук: <http://www.zin.ru/boards/24.1.026.01/theses.html>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ахметова Лилия Агдасовна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Дигенетические трематоды (Trematoda: Digenea) — это наиболее богатая видами группа паразитических плоских червей из таксона Neodermata (Cribb et al., 2001). Самой характерной чертой этих паразитов является наличие сложного жизненного цикла, в котором происходит смена хозяев, чередуются несколько поколений, а также имеются две фазы дисперсии во внешней среде. Наиболее распространенным вариантом жизненного цикла трематод является треххозяинный (триксенный): окончательным хозяином выступают различные позвоночные животные, в качестве первого промежуточного хозяина почти всегда используются моллюски, а роль второго промежуточного хозяина могут выполнять самые разные беспозвоночные и позвоночные животные.

При этом жизненный цикл трематод не укладывается в рамки одной-единственной схемы. Он может как усложняться за счет постциклической передачи марит по пищевой цепи или включения третьего промежуточного хозяина (Галактионов, Добровольский, 1998; Tsuchida et al., 2022), так и упрощаться за счет выпадения из путей циркуляции второго промежуточного или окончательного хозяина, в результате чего циклы становятся вторично диксенными или даже гомоксенными (Poulin, Cribb, 2002). Вероятно, именно пластичность жизненного цикла и стала фактором, позволившим трематодам достичь поразительного эволюционного успеха (Cribb et al., 2021).

Однако нельзя сказать, что мы уже знаем о жизненных циклах трематод все, поскольку они расшифрованы не более чем у 10 % из ~20 000 номинальных видов, кроме того, для целого ряда крупных таксономических групп ранга семейств спектр промежуточных хозяев вовсе неизвестен (Littlewood, 2006; Cribb, Bray, 2011; Blasco-Costa, Poulin, 2017). При этом данные о жизненных циклах имеют очень серьезную прикладную и фундаментальную значимость. С одной стороны, знание спектра промежуточных хозяев облегчает профилактику трематодозов у сельскохозяйственных животных и человека. С другой стороны, данные о жизненных циклах помогают выявлять магистральные направления и закономерности эволюции трематод.

Объектом нашего исследования стали трематоды из групп Acanthocolpidae и Brachycladiidae, объединяемые в надсемейство Brachycladioidea (Pérez-Ponce de León, Hernández-Mena, 2019). Мариты акантокольпид являются всеветно распространенными паразитами морских костистых рыб, а их жизненные циклы обычно реализуются с участием двух промежуточных хозяев: гастропод и рыб (реже — моллюсков). Мариты семейства Brachycladiidae паразитируют исключительно в морских млекопитающих, а их жизненные циклы все ещё остаются нерасшифрованными. Применение молекулярно-генетических методов выявило родство акантокольпид и брахикладиид еще в конце прошлого века (Fernández et al., 1998a). Результаты более поздних исследований продемонстрировали, что брахикладииды являются сестринскими по отношению к одной из двух клад акантокольпид (Bray et al., 2005; Fraija-Fernández et al., 2015).

Близкое родство Acanthocolpidae и Brachycladiidae указывает, что партениты и личинки этих трематод должны обладать сходными чертами строения. Поэтому, возможно, в некоторых предыдущих работах стадии развития из промежуточных хозяев, принадлежащие брахикладидам, были ошибочно идентифицированы как акантокольпиды. Особенно показательны в этом плане данные о жизненных циклах представителей рода *Neophasis* Stafford, 1904, относимого к семейству Acanthocolpidae. Жизненный цикл *Neophasis oculata* (Levinsen, 1881) Miller, 1941 был описан в середине прошлого века Г.К. Чубрик (1966), которая, опираясь на внешнее сходство личинок и марит, считала, что первым промежуточным хозяином этого вида является брюхоногий моллюск *Cryptonatica affinis* (Gmelin, 1791) (Littorinimorpha: Naticidae), вторым промежуточным — двустворчатые моллюски и морские костистые рыбы, а окончательным — морские рыбы. Позднее

в *C. affinis*, а также гастроподах двух видов рода *Neptunea* Röding, 1798 (Neogastropoda: Buccinoidea), были обнаружены редии и церкарии *Neophasis* sp., морфологически сходные, но не идентичные партенитам и личинкам *N. oculata* (Марасаев, 1984). Сомнения в достоверности этих наблюдений возникают сразу, как только мы их поместим в более широкий контекст и сравним с данными о жизненных циклах прочих видов Acanthocolpidae. Так, у подавляющего большинства акантокольпид в качестве первого промежуточного хозяина выступают брюхоногие моллюски из надсемейства Buccinoidea, относящегося к совсем другому нежели *C. affinis* отряду — Neogastropoda (Barnett et al., 2010). Более того, даже в пределах рода *Neophasis* в реализацию жизненного цикла вовлечены гастроподы семейства Buccinidae: вторично диксенный жизненный цикл *Neophasis anarrhichae* (Nicoll, 1909) Bray, 1987 протекает с участием единственного промежуточного хозяина, брюхоногого моллюска *Buccinum undatum* Linnaeus, 1758 (Lebour, 1910; Чубрик, 1966). Наконец, в качестве второго промежуточного хозяина акантокольпид зарегистрированы и рыбы, и двустворчатые моллюски, но кроме *N. oculata* метацеркарий одного и того же вида акантокольпид никогда не находили в обеих этих группах животных.

Исходя из литературных данных мною были сформулированы два предположения. Во-первых, что партениты и личинки, отнесенные Г.К. Чубрик (1966) и С.Ф. Марасаевым (1984) к роду *Neophasis*, могут принадлежать семейству Brachycladiidae. Во-вторых, что истинным первым промежуточным хозяином *N. oculata*, скорее всего, являются брюхоногие моллюски из семейства Buccinidae. Результаты проверки данных предположений позволят получить новые данные по жизненным циклам Acanthocolpidae и Brachycladiidae и на их основе попытаться лучше понять эволюционную историю этих паразитов.

Цель и задачи работы

Целью нашего исследования стало определение основных тенденций в эволюции жизненных циклов трематод из надсемейства Brachycladioidea. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Проверить гипотезу о принадлежности к семейству Brachycladiidae партенит и личинок из натицидных гастропод и двустворчатых моллюсков, ранее отнесенных роду *Neophasis*. Установить филогенетическое положение этих трематод и описать их строение.
2. Пересмотреть устоявшееся в литературе представление о происхождении и эволюции Brachycladiidae.
3. Переописать жизненный цикл *Neophasis oculata*, мартиты которого паразитируют в морских рыбах. Верифицировать диксенный жизненный цикл *N. anarrhichae*.
4. Переописать строение партенит и личинок *N. oculata* и *N. anarrhichae*. Установить филогенетическое положение рода *Neophasis*.
5. Обозначить направление эволюции жизненных циклов для клады Acanthocolpidae, включающей в свой состав представителей рода *Neophasis*. Предложить сценарий возникновения вторично диксенного жизненного цикла *N. anarrhichae*.

Научная новизна исследования

Впервые получены данные о жизненных циклах трематод, использующих в качестве окончательных хозяев морских млекопитающих. Для двух видов семейства Brachycladiidae обнаружены первые промежуточные хозяева: брюхоногие моллюски из семейства Naticidae. Применение молекулярно-генетических методов позволило полностью расшифровать жизненный цикл *Orthosplanchnus arcticus* Odhner, 1905, паразита ластоногих и моржа: его первым промежуточным хозяином является брюхоногий моллюск *Cryptonatica affinis*, вторым промежуточным — двустворчатые моллюски из семейства Cardiidae. Для личинок двух видов изученных брахикладиид получены новые данные о строении.

Впервые с помощью молекулярно-генетических методов продемонстрирована принадлежность трематод рода *Neophasis* к одной из групп в пределах акантокольпид: Acanthocolpidae клады А. Также показано, что первым промежуточным хозяином *Neophasis oculata* являются брюхоногие моллюски из семейства Buccinidae: *Buccinum undatum* и *Neptunea despecta* (Linnaeus, 1758). Подтверждено использование этим видом европейского керчака *Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus, 1758) в качестве одного из вторых промежуточных и окончательных хозяев. Впервые описаны особенности строения церкарий и метацеркарий *N. oculata*. Верифицирован диксенный жизненный цикл *N. anarrhichae*. Дополнены и уточнены имевшиеся в литературе описания материнских и дочерних партенит, а также церкарий и метацеркарий этого вида. Показано, что онтогенез гермафродитного поколения *N. anarrhichae* представляет собой непрерывный процесс: личинки могут полностью завершать свое развитие и приступать к яйцепродукции все еще находясь в единственном промежуточном хозяине — гастроподe *B. undatum*. Таким образом, для этого вида потенциально возможна гомоксенная реализация жизненного цикла.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы дополняют имеющиеся представления о многообразии и пластичности жизненных циклов трематод. Эволюцию этих паразитов нередко представляют как эволюцию их жизненных циклов, а полученные нами результаты впервые позволили поместить представителей надсемейства Brachycladioidea именно в этот контекст. Так, выявление спектра промежуточных хозяев Brachycladiidae дало нам возможность предложить новый взгляд на эволюционное становление этого семейства. В свою очередь, переописание и верификация жизненных циклов двух видов рода *Neophasis*, установление филогенетического положения этих трематод, а также обобщение литературных данных позволили нам очертить вероятное направление эволюции жизненных циклов, морфологии и поведения церкарий в пределах Acanthocolpidae клады А. Наконец, полученные результаты расширяют наши представления о причинах, приводящих к сокращению путей циркуляции и возникновению вторично диксенных жизненных циклов у трематод.

Изучение жизненных циклов паразитических организмов не менее важно с прикладной точки зрения. Без знания спектра промежуточных хозяев очень трудно проводить эффективную профилактику заболеваний, вызываемых патогенными для человека или животных видами трематод. Полученные нами данные о жизненных циклах Brachycladiidae могут быть применены в ветеринарии для борьбы с теми видами этих паразитов, которые вызывают серьезные поражения внутренних органов своих окончательных хозяев, морских млекопитающих.

Наконец, результаты и обобщения, представленные в данной работе, могут быть использованы и уже привлекаются для прочтения курсов лекций по зоологии и паразитологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Возникновение и последующая радиация Brachycladiidae были связаны с полной реорганизацией предкового варианта жизненного цикла.
2. Эволюция трематод Acanthocolpidae клады А была направлена на освоение бентопелагических и пелагических рыб-микрофагов в качестве вторых промежуточных хозяев, и это сопровождалось переходом церкарий к стратегии подражания добычи.
3. Возникновение вторично диксенного жизненного цикла *Neophasis anarrhichae* стало возможным благодаря приобретению непрерывного онтогенеза у гермафродитного поколения предковой формы, а его закрепление было обусловлено взаимоотношениями «хищник-жертва» между промежуточным и окончательным хозяевами.

Степень достоверности и апробация результатов

Представленные в работе результаты получены с использованием прижизненных наблюдений, гистологических методов, конфокальной лазерной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Совокупное использование такого широкого набора методов позволяет составить достаточно полное и подробное описание партенит и личинок трематод. Кроме того, нами были использованы молекулярно-генетические методы, такие как секвенирование фрагментов ядерных и митохондриальных маркеров, последующий молекулярно-филогенетический анализ. Применение этих методов зарекомендовало себя в качестве одного из самых надежных подходов, используемых для расшифровки сложных жизненных циклов трематод (Blasco-Costa, Poulin, 2017). Все представленные в работе результаты были опубликованы в зарубежных журналах высокого рейтинга и прошли независимое международное рецензирование.

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными базами данных научного цитирования Scopus и Web of Science Core Collection. Основные положения диссертации были доложены на следующих конференциях: Всероссийская конференция с международным участием "Современная паразитология – основные тренды и вызовы (VI Съезд Паразитологического общества)" (Санкт-Петербург, 2018); Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ — 2020 (Санкт-Петербург, 2020); XI международная конференция морские млекопитающие Голарктики (Москва, он-лайн, 2021); Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ — 2022 (Он-лайн, 2022); VII Съезд Паразитологического общества: итоги и актуальные задачи (Петрозаводск, 2023).

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и приложения. Основная часть работы изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 225 наименований (33 на русском языке). Приложение к работе (4 страницы) содержит 2 таблицы.

Личный вклад автора

Основная идея работы — необходимость перепроверки данных о спектре промежуточных хозяев *Neophasis* spp. — была сформулирована автором самостоятельно еще во время обучения в магистратуре. Им же был собран материал в полевых условиях: выловлены и вскрыты животные, определены и зафиксированы найденные стадии развития трематод. Практически все представленные в работе данные были получены и проанализированы автором самостоятельно. Исключение составляют только результаты статистического анализа, который был проведен В.А. Крапивиним. В двух из трех публикаций по теме исследования соискатель является первым автором, большая часть работы (не менее 80 %), в том числе концептуализация, изготовление иллюстраций и написание текста статей были выполнены им лично. При подготовке к публикации третьей статьи автор принимал участие в сборе материала, получении результатов, изготовлении иллюстраций, написании и редактировании текста работы.

Благодарности

В первую очередь автор хотел бы выразить благодарность к.б.н. А.А. Добровольскому, который вдохновил меня на изучение трематод. Кроме того, автор бесконечно благодарен своему научному руководителю, к.б.н. Д.Ю. Крупенко, за ее дружбу, наставления и критику во время выполнения данной работы. Автор также крайне признателен Д.Ю. Крупенко и к.б.н. А.Г. Гончар за их неоценимый вклад в редактуру рукописей написанных мною статей. Пользуясь случаем, я хочу выразить свою благодарность д.б.н., профессору А.И. Грановичу и д.б.н., профессору К.В.

Галактионову за их всестороннюю поддержку во время выполнения работы. Наконец, я очень признателен своей супруге, А.Д. Лянгузовой за ее помощь в редакции текста диссертации

Выполнение данной работы было бы невозможно без помощи огромного количества людей, принимавших участие в сборе материала. Я искренне благодарен д.б.н. Г.С. Слюсареву, к.б.н. А.А. Миролубову, к.б.н. П.А. Смирнову, О.В. Князевой, В.А. Крапивину, А.А. Урядовой, А.Е. Зеленской, А.Г. Гублеру, О.А. Скобкиной, С.В. Багрову, О.Н. Котенко, а также многим другим коллегам за их неоценимую помощь во время экспедиций. Отдельно автор хотел бы поблагодарить к.б.н. А.Э. Романович и к.б.н. А.Э. Машарского за оперативное секвенирование изучаемых трематод.

Исследование выполнялось при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-74-10029. Материал собран на полевых стационарах УНБ СПбГУ «Беломорская», ББС ЗИН РАН «Картеш» и ББС МГУ им. Н.А. Перцова. В работе было задействовано оборудование НП СПбГУ, РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и РЦ «Микроскопии и микроанализа», а также приборы ЦКП «Таксон» ЗИН РАН (<http://www.scr-rf.ru/ckp/3038/>) и оборудование лаборатории по изучению паразитических червей и протистов ЗИН РАН.

Основное содержание работы

Глава 1 Обзор литературных данных

В главе рассмотрены следующие вопросы: (1) систематика и филогения трематод из семейств *Acanthocolpidae* и *Brachycladiidae*, исторический аспект и современные молекулярно-генетические данные; (2) общая характеристика жизненных циклов *Acanthocolpidae*, разнообразие спектра промежуточных хозяев; (3) данные о партеногенетических поколениях *Acanthocolpidae*; (4) биология церкарий *Acanthocolpidae*, их строение, поведение и стратегии заражения следующего хозяина; (5) биология метацеркарий *Acanthocolpidae*, их строение, локализация и патогенез; (6) краткая характеристика марит *Acanthocolpidae*; (7) теоретические представления о жизненных циклах *Brachycladiidae* и немногочисленные свидетельства о возможных промежуточных хозяевах, строении и поведении личинок; (8) краткая характеристика марит *Brachycladiidae*.

Глава 2 Материал и методика

Материал был собран в Белом море в 2018-2021 гг., кроме того, в работу были включены моллюски, выловленные в 2015 и 2016 гг. В общей сложности было вскрыто 28 полосатых зубаток *Anarhichas lupus* Linnaeus, 1758; 92 европейских керчака *M. scorpius*; 127 особей *Serripes groenlandicus* (Mohr, 1786) и 39 особей *Ciliatocardium ciliatum* (Fabricius, 1780) (Bivalvia: Cardiidae); 31 *Buccinum scalariforme* Møller, 1842, 2547 *B. undatum* и 119 *Neptunea despecta* (Neogastropoda: Buccinidae); 3 *Amauropsis islandica* (Gmelin, 1791), 24 *Euspira pallida* (Broderip & G. B. Sowerby I, 1829) и 290 *Cryptonatica affinis* (Littorinimorpha: Naticidae). Обнаруженные стадии развития паразитов были зафиксированы для последующего изучения молекулярно-генетическими и морфологическими методами.

Для описания строения партенит, личинок и марит применены стандартные методы гистологии, конфокальной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Общее строение изучали с помощью тотальных препаратов, для изготовления которых метацеркарий и марит убивали нагреванием в капле физраствора и фиксировали 96 % спиртом, или фиксировали в этаноле под давлением покровного стекла. Из фрагментов печени зараженных моллюсков изготавливали мазки, которые фиксировали раствором Шаудина или смесью насыщенного раствора сулемы с ледяной уксусной кислотой. Тотальные препараты окрашивали квасцовым кармином, мазки — квасцовым кармином, железным гематоксилином Гейденгайна или толуидиновым синим. Для изготовления гистологических срезов образцы фиксировали в жидкости Ценкера. Срезы

окрашивали кислым гематоксилином Эрлиха и эозином, либо железным гематоксилином Гейденгайна, либо по Маллори, либо азур II-эозином. Готовые препараты изучали с помощью светового микроскопа Leica DM2500. Фотографии были сделаны на том же микроскопе с помощью камеры Nikon DS Fi3. Измерения выполнены с помощью программного обеспечения Fiji (Schindelin et al., 2012). Для уточнения деталей строения нервной, пищеварительной, протонефридиальной, половой и ряда других систем органов церкарий и метацеркарий, личинок, зафиксированных в 4 % параформальдегиде, обработали антителами к ацетилованному альфа тубулину и фосфотирозину, а также флюоресцентными красителями TRITC-фаллоидином и DAPI. Съемку окрашенных препаратов осуществляли с использованием сканирующего конфокального микроскопа с мультифотонным возбуждением Leica TCS SP5 MP и конфокального лазерного микроскопа LEICA TCS SPE. Ультраструктуру поверхности тегумента личинок и марит изучали на фиксированном в 2,5 %-ном глутаральдегиде материале, высушенном через критическую точку и напыленном платиной. Съемка выполнена на сканирующем электронном микроскопе Quanta 250.

Для проведения молекулярно-генетического анализа были использованы партениты, метацеркарии и мариты, зафиксированные в 96 % спирте. В общей сложности, ДНК выделили из 41 изолята. Выделение ДНК проводили при помощи 5 % раствора ионообменной смолы Chelex 100, содержащего протеиназу К. Для амплификации фрагментов рибосомного оперона (18S и 28S рДНК, ITS1, 5.8S+ITS2) и митохондриальных генов (*cox1*, *nad3*) использовали праймеры и условия ПЦР, опубликованные в литературных источниках (Luton et al., 1992; Bowles et al., 1993; Morgan, Blair, 1995; Tkach et al., 1999; Olson et al., 2003; Leung et al., 2009; Fraija-Fernández et al., 2016; Hernández-Mena et al., 2017). Продукты ПЦР секвенировали с помощью генетического анализатора ABI Prism 3500xl. Сборку, обработку и анализ полученных последовательностей выполняли с использованием программного обеспечения Geneious® 2021.0.2 (<https://www.geneious.com>) и MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Для выявления повторяющихся фрагментов в сиквенсах ITS1 рДНК мы использовали плагин Repeat Finder 1.0.

Для построения молекулярно-филогенетических деревьев взяты имеющиеся в базе данных GenBank последовательности 18S, 28S рДНК и *nad3* мтДНК представителей Acanthocolpidae и Brachycladiidae. Подбор оптимальной эволюционной модели для каждого выравнивания выполняли в программе MEGA 11. Анализ методом максимального правдоподобия (ML) проводили с использованием RAxML (Stamatakis, 2014) на сервере CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org>). Поддержку клад оценивали с помощью 1000 бутстрэп-псевдоповторов. Байесовский анализ выполняли с помощью программного обеспечения MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Продолжительность анализа составила 10 000 000 генераций.

Для анализа морфометрических данных, полученных с тотальных препаратов, использовали стандартные статистические методы (Quinn, Keough, 2002). Уровень значимости меньше 0,05 принимали как достоверный. Для графического представления комплексных различий и сходств между маритами, обычными и прогенетическими метацеркариями *N. anarrhichae*, мы высчитали расстояния Брея-Кёртиса между измеренными особями, которые затем использовались для построения двух графиков неметрического многомерного шкалирования. Все расчеты выполнены с использованием среды для статистического программирования R (Vienna, Austria, R Core Team, 2016).

Глава 3 Жизненные циклы трематод из семейства Brachycladiidae, строение их партенит и личинок

Три гастроподы *Cryptonatica affinis* были заражены редиями и церкариями с парой пигментированных глаз, сходными с партенитами и личинками *Neophasis* sp., обнаруженными С.Ф. Марасаевым (1984) в том же виде брюхоногого моллюска. В двустворчатых моллюсках *Serripes groenlandicus* и *Ciliatocardium ciliatum* мы обнаружили инцистированных метацеркарий с парой

пигментированных глаз, сходных с описанными Г.К. Чубрик (1966) личинками *Neophasis oculata* из бивальвий *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) и *Astarte crenata* (Gray, 1824). Полученные для этого материала молекулярно-генетические данные (18S рДНК, ITS1, *nad3* мтДНК) однозначно показали принадлежность этих партенит и личинок семейству Brachycladiidae. Они оказались стадиями развития вида *Orthosplanchnus arcticus*, последовательности для марит которого имелись в базе данных GenBank (Рис. 1).

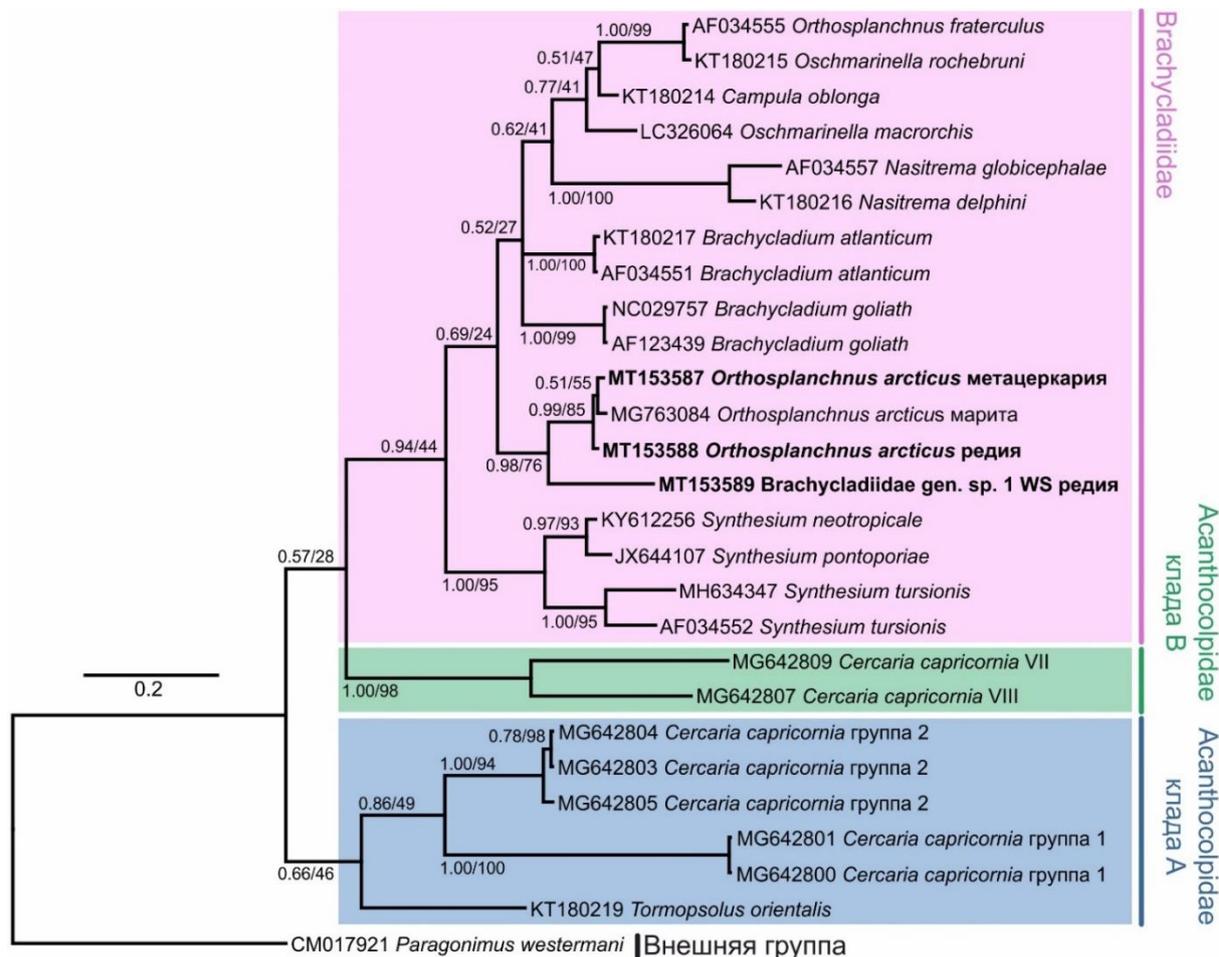


Рисунок 1. Филогенетическое положение Brachycladiidae gen. sp. 1 WS и *Orthosplanchnus arcticus*, основанное на анализе данных *nad3* мтДНК. Молекулярно-филогенетическое дерево построено с помощью Байесовского анализа. Полученные нами последовательности выделены жирным шрифтом. Статистическая поддержка узлов: апостериорная вероятность/бутстрэп. Размерная шкала отражает частоту замен.

Еще одна гастропода *C. affinis* была заражена редиями и церкариями, весьма похожими на партенит и личинок *Neophasis oculata*, описанных Г.К. Чубрик (1966) из того же вида брюхоногого моллюска, если не считать отсутствия пары пигментированных глаз. Полученные для данного изолята последовательности 18S рДНК, ITS1 и *nad3* были проанализированы в BLAST, и оказалось, что эти стадии жизненного цикла ближе всего к представителям семейства Brachycladiidae. Мы временно обозначили этих редий и церкарий как Brachycladiidae gen. sp. 1 WS (где “WS” обозначает “White Sea”, Белое море), поскольку полученные для них последовательности полностью не совпали ни с одним из депонированных в базе данных GenBank сиквенсом марит брахикладиид.

На полученных молекулярно-филогенетических деревьях Brachycladiidae gen. sp. 1 WS и *O. arcticus* оказались сестринскими таксонами, они вместе образуют хорошо поддержанную кладу (Рис. 1, 2). Кроме того, в составе Brachycladioidea нами были выявлены три крупные группы, обладающие высокими значениями статистической поддержки (Рис. 2). В первую вошли все виды рода *Stephanostomum* Looss, 1899, а также виды *Monostephanostomum nolani* Bray & Cribb, 2007, *Pseudolepidapedon balistis* Manter, 1940 и известные только по личинкам *Cercaria capricornia* VII–

VIII; эту группу мы обозначили “Acanthocolpidae клада В”. Вторая группа включает только представителей семейства Brachycladiidae. Третья группа включает оставшиеся виды акантокольпид, она обозначена нами “Acanthocolpidae клада А”. В её состав вошли *Tormopsolus orientalis* Yamaguti, 1934, известные только по личинкам *Cercaria capricornia* 1–3 групп и два вида рода *Pleorchis* Railliet, 1896.

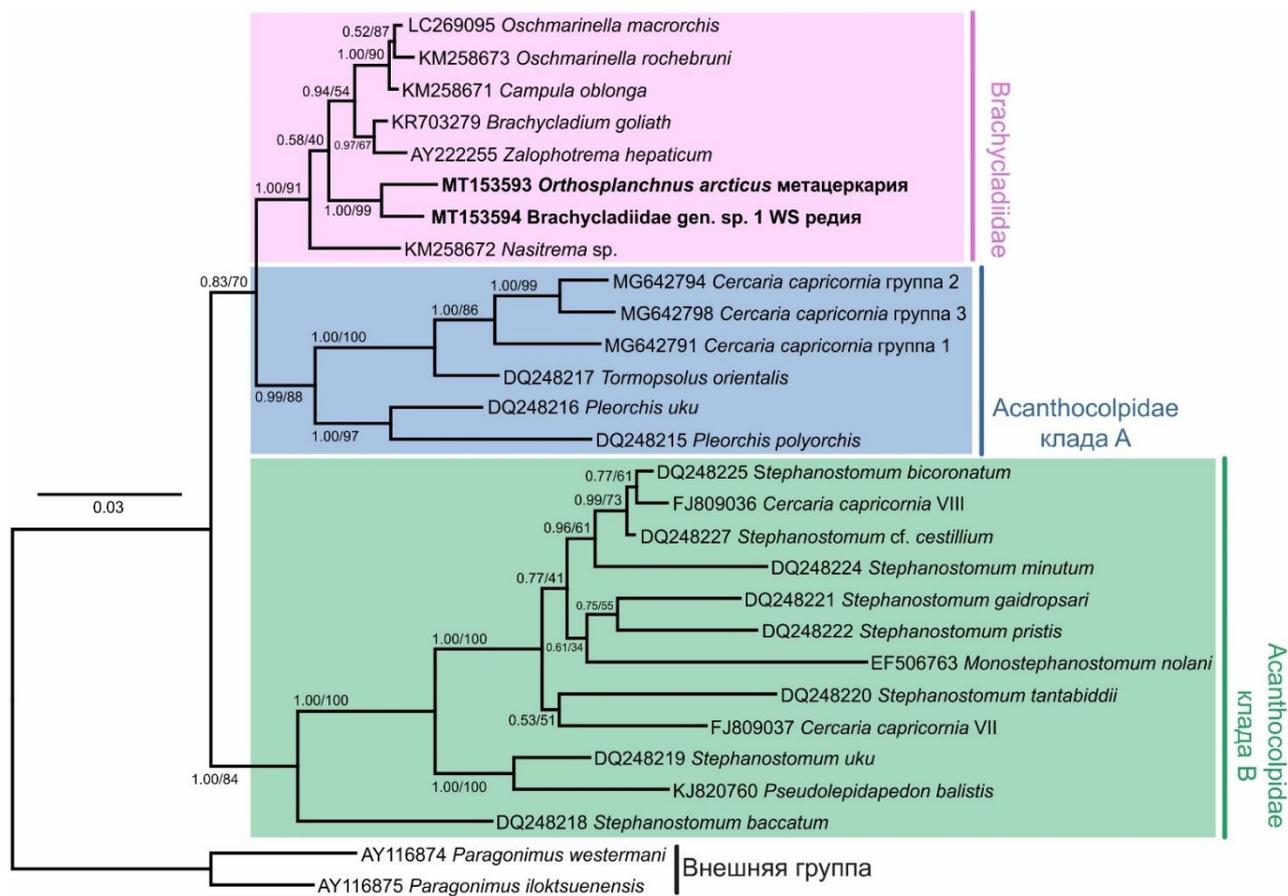


Рисунок 2. Филогенетическое положение *Brachycladiidae gen. sp. 1 WS* и *Orthosplanchnus arcticus*, основанное на анализе данных 28S рДНК. Молекулярно-филогенетическое дерево построено с помощью Байесовского анализа. Полученные нами последовательности выделены жирным шрифтом. Статистическая поддержка узлов: апостериорная вероятность/бутстрэп. Размерная шкала отражает частоту замен.

Редии и церкарии Orthosplanchnus arcticus (Рис. 3)

Паразитируют в гонаде и гепатопанкреасе хозяина. Церкарии небольшого размера, с простым хвостом, слегка превышающим длину тела. Tegument тела равномерно покрыт шипами, их размер уменьшается к заднему концу. Ротовая присоска чуть крупнее брюшной. Префаринкс длинный, глотка овальная, зачаток пищевода короткий. Зачатки задних ветвей кишки состоят из столбика клеток и тянутся до заднего конца тела по бокам от мочевого пузыря. Присутствуют короткие зачатки передних ветвей кишечника. Имеется церебральный ганглий, два пигментированных глаза и непарный непигментированный фоторецептор. Девять крупных желез проникновения расположены в передней части тела, проток одной из них не был обнаружен. Протоки остальных восьми клеток направлены в сторону переднего конца тела, две пары протоков расположены медиальнее пигментированных глаз, оставшиеся две пары — латеральнее. Протонефридиальная система мезостомного типа. Стенки мочевого пузыря толстые, содержат гранулы. Экскреторная

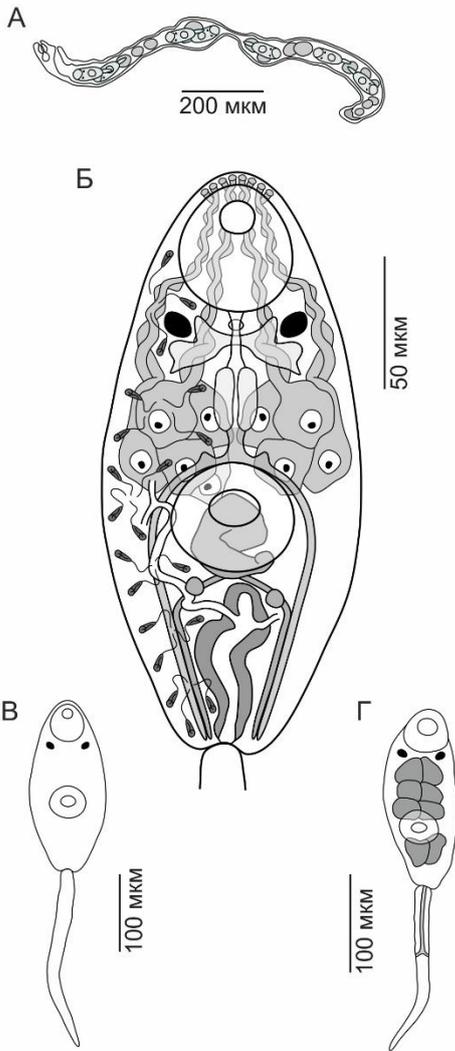


Рисунок 3. Редия и церкария *Orthosplanchnus arcticus*: редия (А), строение сформированной церкарии (Б) и ее общий вид (В), мукоидные железы и каудальный экскреторный канал развивающейся личинки (Г).

формула $2[(3 + 4 + 4) + (3 + 3 + 3)] = 40$. Каудальный экскреторный канал имеется в хвосте развивающихся церкарий, но отсутствует у полностью сформированных личинок. Зачаток половой системы расположен дорсальнее брюшной присоски. В его составе имеются зачатки гонад, желточников и протоков мужской и женской половой системы. Церкарии покидают редий недоразвитыми, их морфогенез завершается в тканях моллюска-хозяина. Формирующиеся личинки обладают четырьмя парами мукоидных желез, расположенных на вентральной части тела и чехлообразующими железами, расположенными в дорсальной части тела и хвосте.

Метацеркарии Orthosplanchnus arcticus (Рис. 4)

В двустворчатых моллюсках метацеркарии локализуются преимущественно в мускулатуре внутренностного мешка. В гастроподe *S. affinis* инцистированные метацеркарии были обнаружены в гепатопанкреасе хозяина, вместе с редиями, развивающимися и сформированными церкариями *O. arcticus*. Метацеркарии заключены в однослойную тонкостенную цисту. Личинки небольшого размера, их тегумент равномерно покрыт шипами. Ротовая и брюшная присоски имеются. Префаринкс короткий, глотка овальная, пищевод короткий.

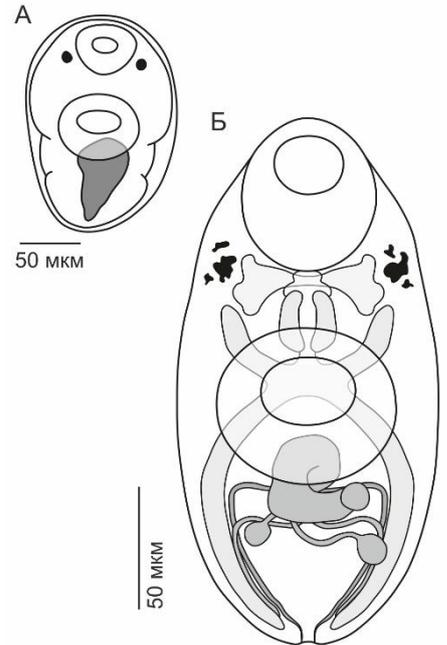


Рисунок 4. Метацеркария *Orthosplanchnus arcticus* из двустворчатого моллюска *Serripes groenlandicus*, личинка внутри цисты (А) и извлеченная из цисты (Б).

Передние ветви кишки практически достигают передней части глотки. Задние ветви кишки тянутся до задней части тела, по бокам от мочевого пузыря. Зачатки ветвей кишки состоят из двух рядов вакуолизированных клеток, просвет отсутствует. Церебральный ганглий имеется, пигментированные глаза разобраны. Железы проникновения отсутствуют. Мочевой пузырь тонкостенный, овальной формы. Зачаток половой системы чуть более дифференцирован, чем у церкарии (отчетливо выявляются семявыносящие каналы).

Редии и церкарии Brachycladiidae gen. sp. 1 WS (Рис. 5)

Паразитируют в гонаде и гепатопанкреасе моллюска-хозяина. Церкарии небольшого размера, с простым хвостом, последний примерно в 2,5 раза длиннее тела. Тегумент тела равномерно покрыт шипами, их размер уменьшается к заднему концу. Ротовая присоска чуть крупнее брюшной. Префаринкс длинный, глотка овальная, зачаток пищевода короткий. Зачатки задних ветвей кишки состоят из столбика клеток и тянутся до заднего конца тела по бокам от мочевого пузыря. Зачатки передних слепых ветвей кишки не обнаружены. Имеется церебральный ганглий и три непигментированных фоторецептора, два латеральных и один медиальный. Восемь крупных желез проникновения расположены в передней части тела, проток одной из них не был обнаружен.

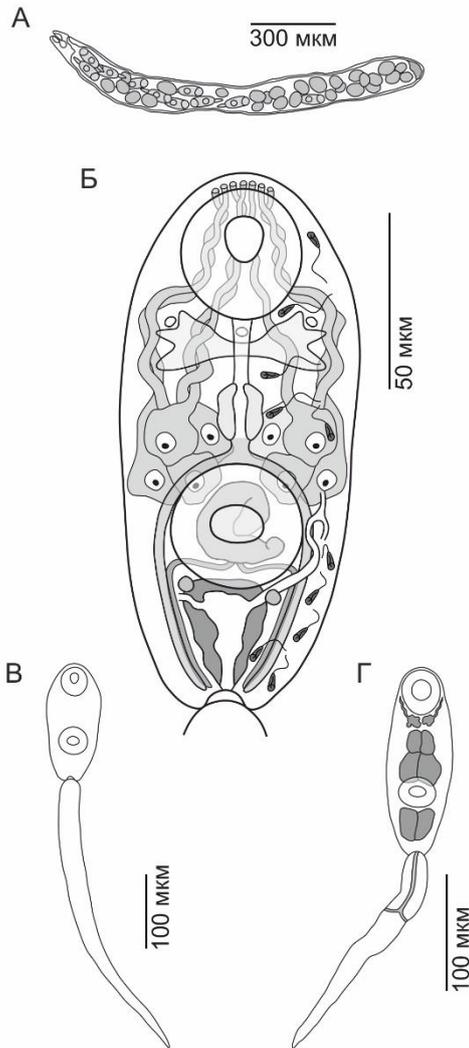


Рисунок 5. Редия и церкария *Brachycladiidae* gen. sp. 1 WS: редия (А), строение сформированной церкарии (Б) и ее общий вид (В), мукоидные железы и каудальный экскреторный канал развивающейся личинки (Г).

Протоки остальных семи клеток направлены в сторону переднего конца тела, три из них расположены медиальнее непигментированных фоторецепторов, оставшиеся четыре — латеральнее. Протонефридиальная система мезостомного типа. Стенки мочевого пузыря толстые, содержат гранулы. Экскреторная формула $2[(2 + 1 + 2) + (2 + 1 + 2)] = 20$. Каудальный экскреторный канал имеется в хвосте развивающихся церкарий, но отсутствует у полностью сформированных личинок. Зачаток расположен дорзальнее брюшной присоски. В его составе имеются зачатки гонад, желточников и протоков мужской и женской половой системы. Церкарии покидают редий недоразвитыми, их морфогенез завершается в тканях моллюска-хозяина. Формирующиеся личинки обладают четырьмя парами мукоидных желез, расположенных на вентральной части тела и чехлообразующими железами, расположенными в дорзальной части тела и хвосте.

Обсуждение

Предлагаемая схема жизненного цикла *O. arcticus* представлена на Рис. 6. В качестве его окончательного хозяина (см. обзор в Andersen-Ranberg et al., 2018) выступают различные виды ластоногих, из которых в Белом море самыми многочисленными являются лахтак и кольчатая нерпа (Svetocheva, Svetochev, 2015). Роль первого промежуточного хозяина *O. arcticus* выполняет ценогастропода *C. affinis*. Сформированные церкарии покидают криптонатику и заражают вторых промежуточных хозяев, двустворчатых моллюсков из семейства *Cardiidae*. Примечательно, что для *O. arcticus* возможно факультативное сокращение путей циркуляции, поскольку некоторые церкарии не покидают первого промежуточного хозяина, а инцистируются

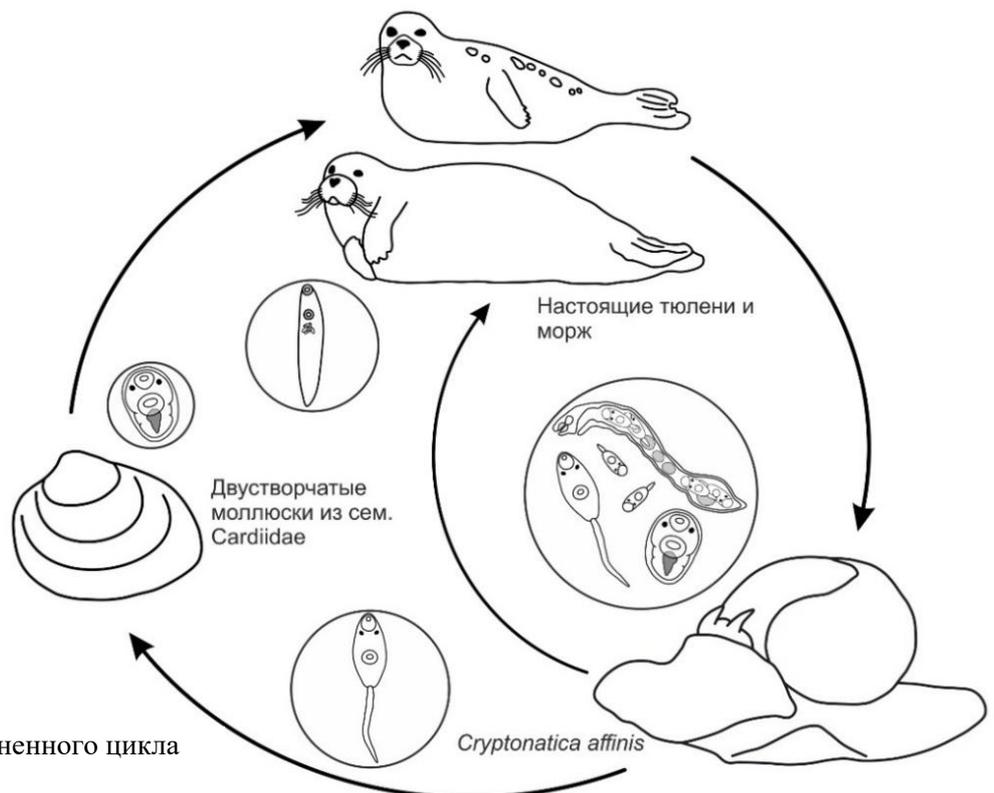


Рисунок 6. Предлагаемая схема жизненного цикла *Orthosplanchnus arcticus*.

и превращаются в метацеркарий прямо в нем. Заражение окончательных хозяев происходит в результате поедания двустворчатых моллюсков или гастропод *C. affinis*, содержащих инцистированных метацеркарий, что косвенно подтверждается литературными данными о питании тюленей. Лахтак является бентофагом с широким пищевым спектром, включающим в себя гастропод и двустворчатых моллюсков, а кольчатая нерпа, хотя и питается в основном рыбами и ракообразными, тоже способна питаться двустворчатыми моллюсками (Svetocheva, Svetochev, 2015).

Глава 4 Жизненные циклы трематод из семейства Acanthocolpidae, строение их партенит и личинок

Мариты акантокольпид, которых можно было однозначно определить как *Neophasis oculata* и *N. anarrhichae*, были обнаружены в европейском керчаке и полосатой зубатке, соответственно. Найденные в керчаке метацеркарии с парой пигментированных глаз были предварительно отнесены к виду *N. oculata*. Множество случаев заражения дочерними редиями акантокольпид было найдено в брюхоногом моллюске *Buccinum undatum*, и несколько — в *Neptunea despecta*. Большинство обнаруженных в *B. undatum* партенит и личинок Acanthocolpidae соответствовали описанным в литературе редиям, церкариям и метацеркариям *N. anarrhichae* (Lebour, 1910; Чубрик, 1966; Кюе, 1969). Однако в нескольких зараженных букцинумах и во всех зараженных нептунеях мы нашли дочерних редий, в зародышевой полости которых находились акантокольпидные церкарии, обладающие более крупными пигментированными глазами, и, вероятно, относящиеся к виду *N. oculata*. Наконец, в нескольких особях букцинумов мы обнаружили материнских спороцист и материнских редий неизвестного вида трематод, и предположили, что они также могут принадлежать семейству Acanthocolpidae.

Проведенный для этого материала молекулярно-генетический анализ (37 изолятов) позволил нам выделить две группы. В первую вошли все мариты, определенные по особенностям строения как *N. anarrhichae* (7 изолятов), дочерние редии из обыкновенных букцинумов, предположительно относящиеся *N. anarrhichae* (8 изолятов), а также обнаруженная в обыкновенных букцинумах материнская спороциста (1 изолят) и материнские редии (3 изолята). Вторую группу составили все мариты, определенные по особенностям строения как *N. oculata* (3 изолята), метацеркарии из керчаков (4 изолята) и дочерние редии из обыкновенных букцинумов и нептуней (11 изолятов). Внутри этих групп изменчивость по рибосомальным маркерам отсутствовала. Различия между этими группами по тем же маркерам были очень невелики и составили одну нуклеотидную замену по 5.8S+ITS2, две замены по 18S рДНК и восемь замен по ITS1. Последовательности ITS1 также различались по своей длине, что было обусловлено содержанием разного количество повторяющихся фрагментов длиной 47 пар нуклеотидов (п.н.): девятью в случае *N. oculata* (вторая группа) и семью у *N. anarrhichae* (первая группа). Наконец, две эти группы не различались между собой по последовательности 28S рДНК длиной 1263–1270 п.н.

Для более четкого установления внутри- и межвидовых границ для изолятов из обеих групп был отсеквенирован фрагмент гена *cox1* мтДНК. Выравнивание 16 последовательностей *cox1*, полученных для *N. oculata*, выявило восемь полиморфных сайтов, а среднее значение

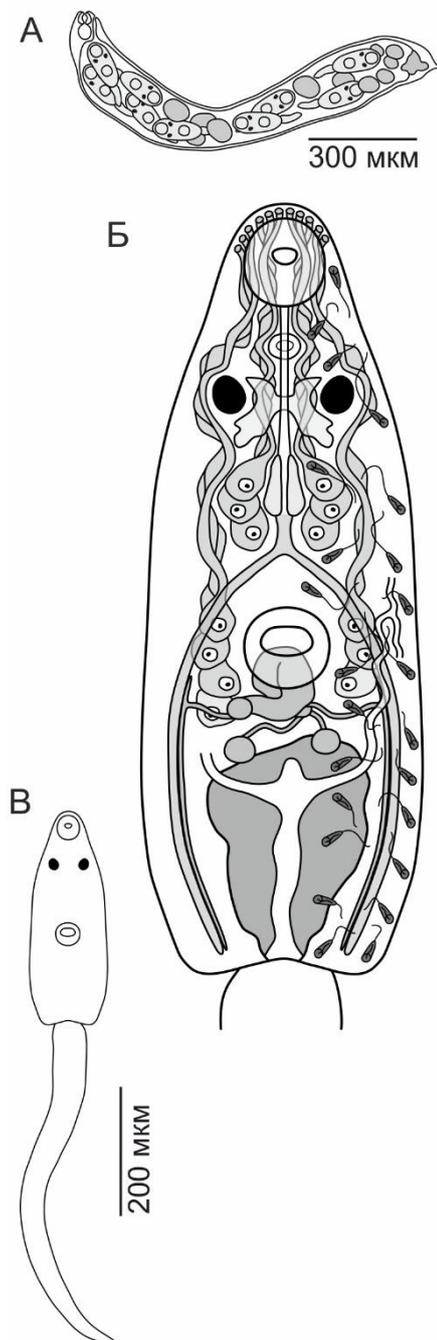


Рисунок 7. Дочерняя редия и церкария *Neophasis oculata*: дочерняя редия (А), строение сформированной церкарии (Б) и ее общий вид (В).

формула $2[(4 + 4 + 4) + (4 + 4 + 4)] = 48$. Каудальный экскреторный канал имеется в хвосте развивающихся церкарий, но отсутствует у полностью сформированных личинок. Зачаток половой системы расположен дорзальнее брюшной присоски. В его составе имеются зачатки гонад, желточников и протоков мужской и женской половой системы. Церкарии покидают редий недоразвитыми, их морфогенез завершается в тканях моллюска-хозяина. Формирующиеся личинки обладают только чехлообразующими железами, расположенными в дорзальной части тела и хвосте.

Метацеркарии Neophasis oculata (Рис. 8)

Метацеркарии заключены в округлую цисту, снаружи от которой присутствует рыхлая и непрозрачная оболочка. Личинки достаточно крупные, их тегумент равномерно покрыт шипами, уплощенными и зазубренными в передней части тела и игловидными в задней. Брюшная присоска чуть крупнее ротовой. Префаринкс длинный, глотка овальная, пищевод короткий. Ветви кишки широкие, тянутся до заднего конца тела, просвет в них сформирован. Церебральный ганглий

внутривидовой генетической изменчивости составило $0,0030 \pm 0,0013$ замен на позицию (0,3 %). Выравнивание 18 последовательностей *cox1*, полученных для *N. anarrhichae*, выявило 12 полиморфных сайтов, а среднее значение внутривидовой генетической изменчивости составило $0,0040 \pm 0,0016$ замен на позицию (0,4 %). Среднее значение межвидовой генетической изменчивости между изолятами *N. anarrhichae* и *N. oculata* составило $0,1573 \pm 0,0887$ замен на позицию (15,73 %). Поскольку среднее значение генетической изменчивости между двумя группами образцов значительно превышает значения изменчивости внутри групп, не остается никаких сомнений, что мы имеем дело с двумя самостоятельными видами.

Редии и церкарии Neophasis oculata (Рис. 7)

Паразитируют в гонаде и гепатопанкреасе моллюска-хозяина. Относительно крупные церкарии с простым хвостом, последний почти в полтора раза длиннее тела. Тегумент тела равномерно покрыт игловидными шипами, их размер уменьшается к заднему концу. Ротовая присоска чуть крупнее брюшной. Префаринкс длинный, глотка грушевидная, зачаток пищевода короткий. Зачатки ветвей кишки представлены столбиком клеток и тянутся до заднего конца тела по бокам от мочевого пузыря. Имеется церебральный ганглий, два пигментированных глаза и непигментированный фоторецептор. Железы проникновения собраны в две группы, всего 13 клеток. Передняя группа состоит из шести клеток, расположенных по бокам от глотки; протоки этих желез направлены в сторону переднего конца тела и залегают медиальнее пигментированных глаз. Задняя группа составлена семью клетками, расположенными по бокам и чуть позади брюшной присоски; только у пяти желез этой группы были обнаружены протоки, которые направлены в сторону переднего конца тела и залегают латеральнее тел желез передней группы и пигментированных глаз. Протонефридиальная система мезостомного типа. Стенки мочевого пузыря толстые, содержат гранулы. Экскреторная

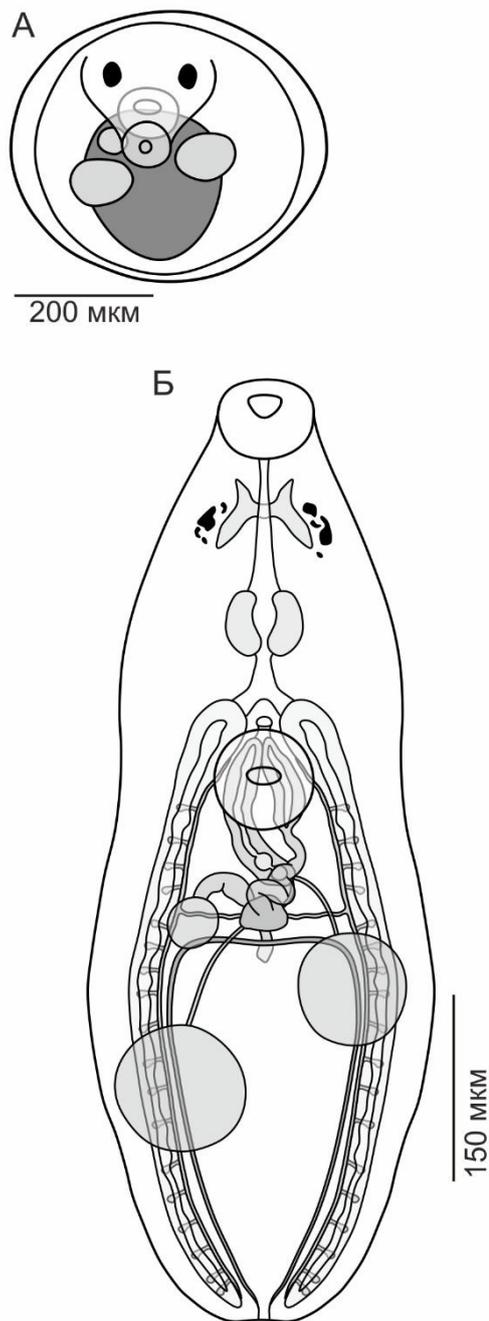


Рисунок 8. Метациркария *Neophasis oculata*, личинка внутри цисты (А) и извлеченная из цисты (Б).

префаринкс, глотку, зачаток пищевода и ветвей кишечника (состоят из столбика клеток). Церкарии обладают 13 железами проникновения и 11 ассоциированными с ними протоками. Протонефридиальная система мезостомного типа. Мочевой пузырь тонкостенный. В хвосте имеется каудальный экскреторный канал. Чехлообразующие железы и мукоидные железы отсутствуют. Метациркарии часто сохраняют короткий хвост, каудальный экскреторный канал в котором отсутствует. Все элементы половой системы метациркарий четко различимы, в яичнике и семенниках зачастую наблюдаются ранние этапы гаметогенеза. В мужских гонадах могут присутствовать сформированные сперматозоиды. Метациркарии могут приступать к яйцепродукции все еще находясь в зародышевой полости дочерних редиий, что мы наблюдали у 21 зараженного хозяина в течение 2019–2021 гг. Проведенный статистический анализ размерных характеристик марит, обычных и прогенетических метациркарий *N. anarrhichae* не выявил достоверных различий между размерами соматических систем органов марит и прогенетических

имеется, пигментированные глаза разобраны. Железы проникновения отсутствуют. Мочевой пузырь тонкостенный, яйцевидной формы. Половая система не полностью сформирована, но в ее составе имеются зачатки всех протоков, желез и гонад. Гаметогенез в семенниках и яичнике не начинается. Просвет в протоках половой системы не сформирован.

Материнская спороциста Neophasis anarrhichae

Паразитируют в почке хозяина, где одновременно может находиться от одной до 10 особей материнских спороцист. Передний конец тела спороцисты расширен, задний сужен. Зародышевая полость содержит эмбрионы материнских редиий. Герминальная масса находится в задней части тела, погружена в паренхиму.

Материнские редию Neophasis anarrhichae

Паразитируют в почке и гепатопанкреасе хозяина. Тело вытянутое, задний конец тела заострен. Редию подвижны. Ротовое отверстие расположено терминально, глотка небольшая, овальная, кишка овальная. Зародышевая полость занимает практически все пространство внутри тела, содержит эмбрионы редиий на разных этапах развития. Родильная пора и хорошо выраженный родильный канал расположены позади глотки. Герминальная масса находится в задней части тела, погружена в паренхиму. У молодых редиий кишка может занимать до трети длины тела; зародышевая полость у таких червей выражена слабо, а эмбрионы в ней отсутствуют.

Дочерние редию, церкарии и метациркарии Neophasis anarrhichae

Эти стадии развития неоднократно были описаны в литературе (Lebour, 1910; Чубрик, 1966; Kjøie, 1969, 1971), однако нам удалось прояснить некоторые детали их строения.

Дочерние редию снабжены родильным каналом и родильной порой. Пигментированные глаза у церкарий закладываются сильно позже формирования хвостовой почки, меньше по размеру чем у *N. oculata*. Непигментированный фоторецептор имеется. Пищеварительная система включает

личинок. Обе эти группы достоверно отличались от обычных метацеркарий. Анализ размерных характеристик органов половой системы показал, что все три группы не пересекаются между собой. При этом наибольший вклад в разделение прогенетических метацеркарий и марит внес размер яичника (у марит яичник крупнее).

Для установления филогенетического положения рода *Neophasis* было построено молекулярно-филогенетическое дерево, основанное на анализе конкатенированного набора данных (18S и 28S рДНК). На полученном филогенетическом дереве анализируемые трематоды разделились на три хорошо поддержанные монофилетические группы: Acanthocolpidae клада В, Acanthocolpidae клада А и Brachycladiidae (Рис. 9). Два вида рода *Neophasis* формируют хорошо поддержанную ветвь внутри Acanthocolpidae клады А. В состав клады А также входят *Tormopsolus orientalis* и *Pleorchis* spp., однако порядок ветвления в пределах Acanthocolpidae клады А не был разрешен в нашем анализе.

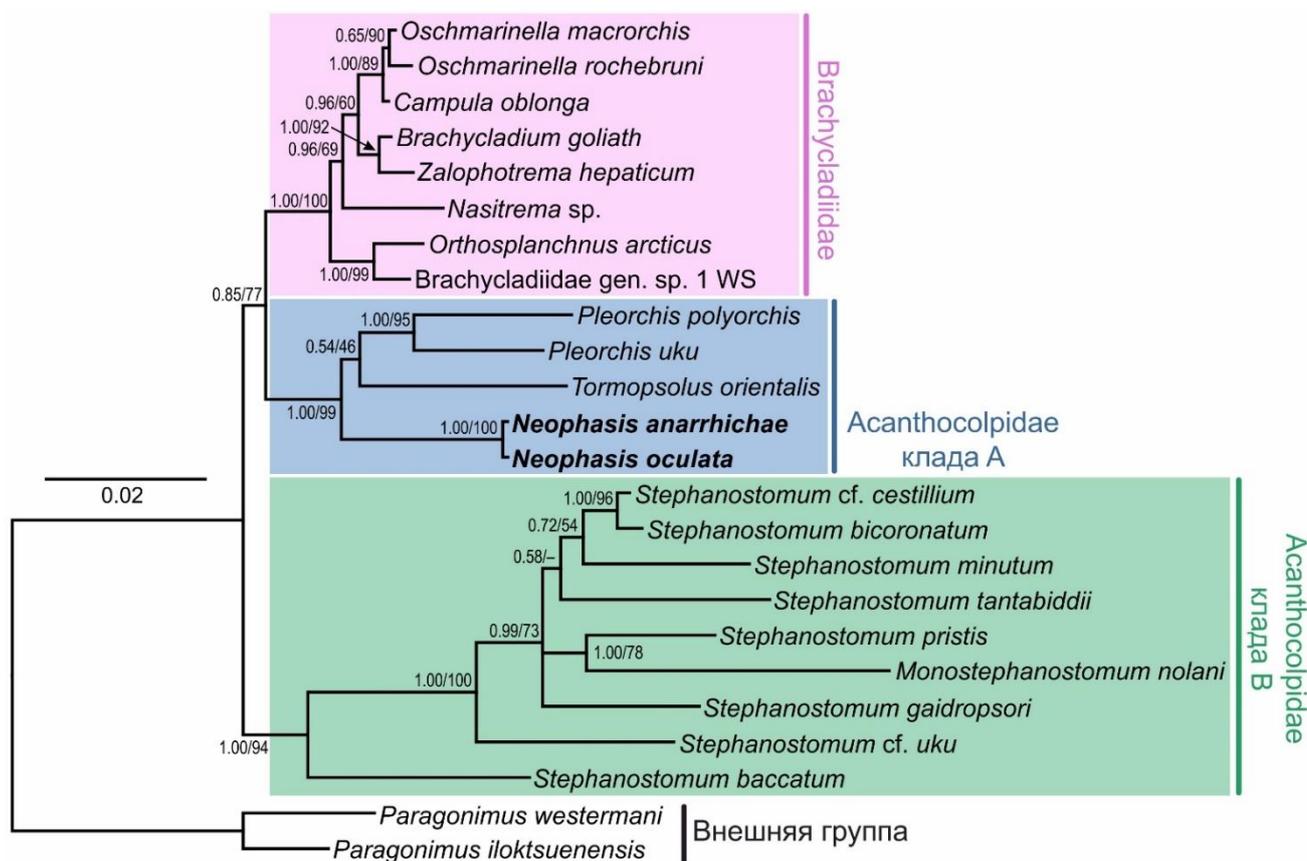


Рисунок 9. Филогенетическое положение *Neophasis anarrichae* и *N. oculata*, основанное на конкатенированном наборе данных 18S и 28S рДНК. Молекулярно-филогенетическое дерево построено с помощью Байесовского анализа. Полученные нами последовательности выделены жирным шрифтом. В узлах указаны значения апостериорной вероятности. В узлах, также поддержанных и в анализе максимального правдоподобия, указаны значения бутстрэпа. Размерная шкала отражает частоту замен.

Обсуждение

Полученные нами данные позволили верифицировать жизненный цикл *N. anarrichae* и переписать жизненный цикл *N. oculata* (Рис. 10). Мы показали, что истинными первыми промежуточными хозяевами *N. oculata* являются гастроподы *B. undatum* и *N. despecta*, вторыми промежуточными хозяевами — бентосные рыбы (в частности, европейский керчак). Окончательными хозяевами служат морские рыбы, преимущественно представители семейства Cottidae (см. обзор Bray, Gibson, 1991). Единственным промежуточным хозяином *N. anarrichae* является обыкновенный букцидум, в котором было задокументировано развитие материнских и дочерних партеногенетических поколений, а также церкарий и метацеркарий. Материнская

спороциста *N. anarrhichae* паразитирует в почке букцинума, где отрождает материнских редий. Материнские редии поначалу накапливаются в почке, а затем мигрируют в гепатопанкреас и гонаду моллюска, где начинают продуцировать дочерних редий. В зародышевой полости дочерних редий формируются церкарии, которые без инцистирования развиваются в инвазионных для окончательного хозяина метацеркарий. Последние могут достигать половозрелости и приступать к яйцепродукции все еще находясь внутри дочерних редий. Окончательные хозяева (в Белом море — только полосатая зубатка) заражаются при поедании букцинумов, содержащих метацеркарий.

По своим морфометрическим характеристикам прогенетические метацеркарии *N. anarrhichae* почти идентичны маритам этого вида из зубатки. Мы называем приступивших к яйцепродукции личинок этого вида прогенетическими, исходя из определения термина прогенеза, принятого в

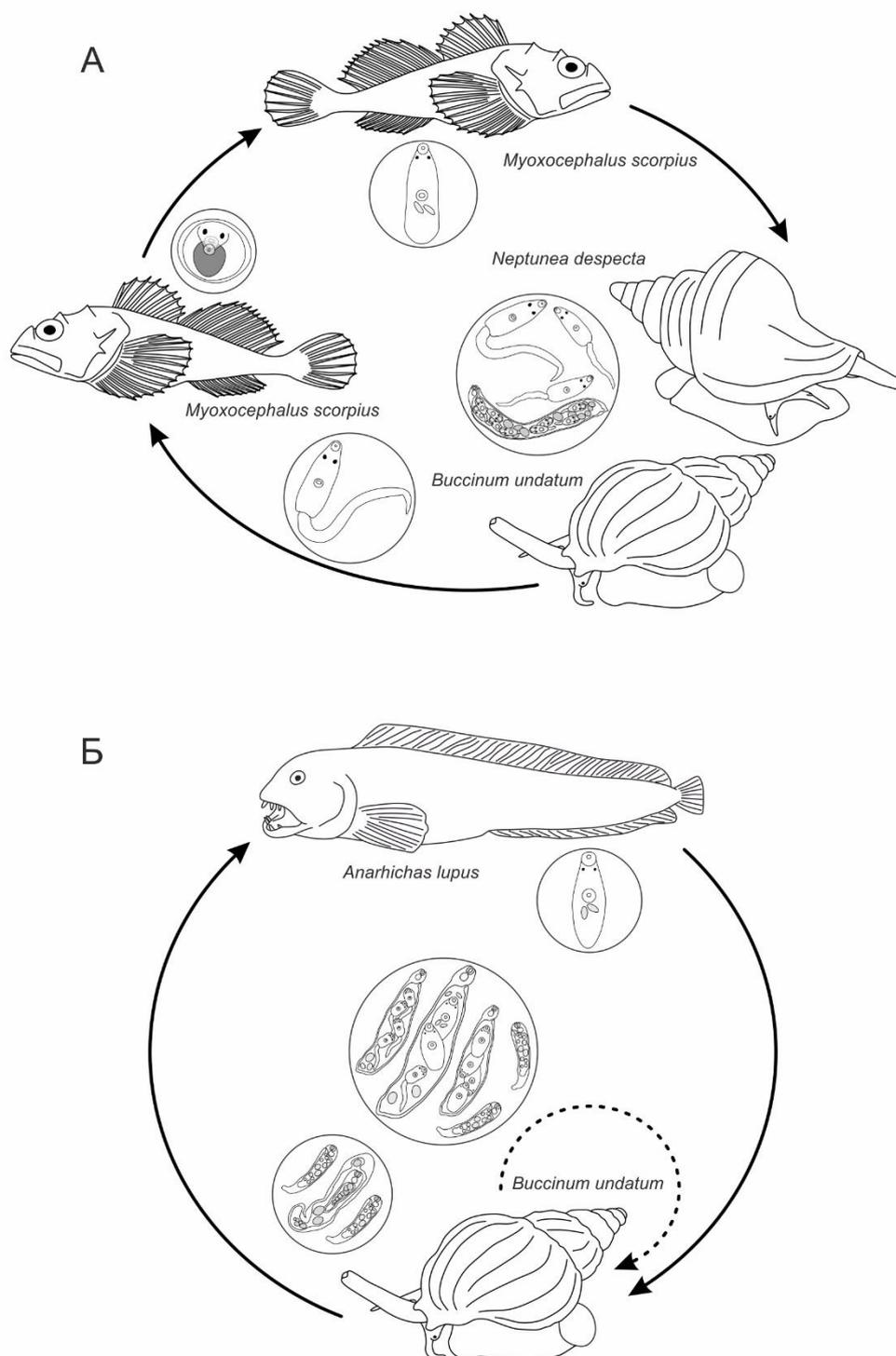


Рисунок 9. Предлагаемая схема жизненного цикла *Neophasis oculata* (А) и *N. anarrhichae* (Б).

паразитологической литературе, т.е. для обозначения стадий развития паразита, у которых половые и соматические системы органов оказываются полностью сформированными до момента попадания в окончательного хозяина (Lefebvre, Poulin, 2005). Ключевыми различиями между прогенетическими метацеркариями и маритами *N. anarrhichae* являются размер яичника и яиц, а также жизнеспособность формируемых яиц, которые являются у личинок преимущественно абортивными. В том случае, если в яйцах прогенетических метацеркарий способен сформироваться инвазионный мирацидий, мы имеем дело с факультативно гомоксенным жизненным циклом, крайне редко встречающемся среди трематод. Из всех гипотез, способствующих возникновению прогенеза у трематод, для *N. anarrhichae* наиболее подходит «гипотеза времени развития», согласно которой возможность перехода к прогенезу определяется временем, проведенным паразитом внутри хозяина, безотносительно вероятности трансмиссии (Poulin, Cribb, 2002; Lagrue, Poulin, 2009). Больше того, это объяснение органично сочетается с особенностями онтогенеза гермафродитного поколения *N. anarrhichae* (см. ниже).

Глава 5 Обсуждение. Морфология личинок, жизненные циклы и эволюция трематод из таксона Brachycladioidea

5.1 Эволюционные особенности строения личинок надсемейства Brachycladioidea

Опираясь на полученные нами данные, можно выделить ряд морфологических признаков, плезиоморфных для церкарий надсемейства Brachycladioidea. К ним относятся: (1) две присоски; (2) простой хвост; (3) вооруженный шипами тегумент; (4) три фоторецептора, два пигментированных и один непигментированный; (5) железы проникновения; (6) протонефридиальная система «мезостомного» типа, каудальный экскреторный канал в хвосте развивающихся личинок, шесть первичных групп циртоцитов; (7) секреторные гранулы в цитонах выстилки мочевого пузыря; (8) сложно устроенный зачаток половой системы.

При этом некоторые особенности строения изученных нами церкарий существенно различаются. Так, церкарии Brachycladiidae, по сравнению с личинками *Neophasis oculata*, обладают меньшими размерами тела, меньшим количеством циртоцитов, меньшим числом желез проникновения и менее дифференцированным зачатком половой системы (Рис. 3, 5, 7). Все это позволяет заключить, что основным направлением в эволюции строения церкарий Brachycladiidae могла быть миниатюризация и ювенилизация, тренд, достаточно широко распространенный среди церкарий трематод в целом (Гинецинская, 1968; Галактионов, Добровольский, 1998). Те же самые тенденции, вероятно, характерны и для метацеркарий брахикладиид. Личинки *O. arcticus* обладают небольшими размерами, слабо дифференцированными зачатками пищеварительной и половой систем органов. В противовес им, подавляющее большинство метацеркарий акантокольпид обладают крупными размерами тела, а многие из них характеризуются хорошо развитой пищеварительной системой, со сформированным просветом в ветвях кишечника, и дифференцированной половой системой, в составе которой имеются зачатки всех желез и протоков (Рис. 4, 8; Yamaguti, 1946; Wolfgang, 1955; Overstreet, Hochsberg, 1975).

5.2 Жизненные циклы Brachycladioidea. Эволюционное становление трематод семейства Brachycladiidae

Практически все известные виды Brachycladiidae в качестве окончательных хозяев используют морских млекопитающих (Fraija-Fernández et al., 2016), однако промежуточные хозяева этих трематод до самого недавнего времени были неизвестны. Нам впервые удалось показать, что первыми промежуточными хозяевами двух видов брахикладиид, *O. arcticus* и Brachycladiidae gen. sp. 1 WS, являются гастроподы из семейства Naticidae, а в качестве второго промежуточного хозяина вид *O. arcticus* использует двустворчатых моллюсков. Натицидные гастроподы обладают всесветным распространением и населяют самые разные биотопы: от литоральной зоны и до

абиссали (Huelsen et al., 2008), что делает их вероятным кандидатом на роль первых промежуточных хозяев и у других видов брахикладиид. Это допущение вполне соответствует устоявшемуся представлению об узкой специфичности трематод по отношению к первому промежуточному хозяину (Гинецинская, 1968; Галактионов, Добровольский, 1998), которая нарушается в исключительно редких случаях. При этом спектр вторых промежуточных хозяев Brachycladiidae вряд ли ограничен двустворчатыми моллюсками. Мы не отказываемся от высказываемых ранее в литературе идей, что его роль также могут играть головоногие моллюски и рыбы (Делямуре, 1955; Andersen-Ranberg et al., 2018; Nakagun et al., 2018).

В отличие от брахикладиид, мариты акантокольпид паразитируют в морских рыбах (Bray, 2005). Первыми промежуточными хозяевами у Acanthocolpidae кледы А выступают брюхоногие моллюски из семейств Buccinidae, Nassariidae и Pisaniidae (Neogastropoda: Buccinoidea), что было показано для *Cercaria capricornia* групп 1–3, *N. anarrichae*, *N. oculata* и *Tormopsolus* sp. (Рис. 10; Lebour, 1910; Bartoli, Gibson, 1998; Barnett, Miller, 2018; Kremnev et al., 2021). Вторыми промежуточными хозяевами этих трематод, если они известны, служат морские костистые рыбы (Yamaguti, 1936; Bartoli, Gibson, 1998; Kremnev et al., 2021). Первыми промежуточными хозяевами Acanthocolpidae кледы В в подавляющем большинстве случаев выступают гастроподы из таксона Buccinoidea, представители семейств Buccinidae и Nassariidae (Miller, Northup, 1926; Martin, 1939; Wolfgang, 1955; Stunkard, 1961; Madhavi, Shameem, 1993; Barnett et al., 2010). Единственным исключением является вид *Stephanostomum caducum*, редии и церкарии которого развиваются в *Euspira nitida* (Donovan, 1804), представителе семейства Naticidae (Køie, 1978). Вторыми промежуточными хозяевами Acanthocolpidae кледы В выступают, преимущественно, морские костистые рыбы (Yamaguti, 1936; Martin, 1939; Wolfgang, 1955; Stunkard, 1961; Køie, 1978; Vidal-Martínez et al., 2012; Bennett et al., 2023), однако метацеркарии *Stephanostomum* spp. также могут паразитировать в головоногих и двустворчатых моллюсках (Overstreet, Hochberg, 1975; Madhavi, Shameem, 1993; Pérez-Urbiola, Martínez-Díaz, 2001).

Таким образом, характер жизненного цикла у представителей Acanthocolpidae кледы А и В, в целом, сходный, и может быть обобщен до схемы «гастропода из таксона Buccinoidea—рыба—рыба». *Stephanostomum caducum* представляет собой единственное исключение, что можно объяснить либо колонизацией нового первого промежуточного хозяина в пределах рода *Stephanostomum*, либо некорректностью данных, полученных М. Койе (Køie, 1978). Окончательный вывод можно будет сделать только после переописания жизненного цикла *S. caducum* с использованием молекулярно-генетических методов.

Всё это позволяет нам пересмотреть имеющееся объяснение происхождения трематод из семейства Brachycladiidae. В литературе прочно укоренилось представление, что отделение брахикладиид от акантокольпид произошло в результате колонизации (“host-switch”) морских млекопитающих (Cable, 1974; Fernández et al., 1998b; Bray et al., 2005; Fraija-Fernández et al., 2015, 2016). Предполагалось, что единственное изменение, которое претерпел жизненный цикл предков Brachycladiidae, заключалось в переходе от исторического окончательного хозяина, рыбоядной рыбы, к морским млекопитающим, а спектр промежуточных хозяев оставался тем же самым, что мы наблюдаем у акантокольпид. Однако теперь нам известно, что в реализации жизненных циклов Acanthocolpidae и Brachycladiidae принимают участие принципиально разные первые промежуточные хозяева: Buccinoidea и Naticidae, соответственно. Именно поэтому мы предполагаем, что эволюционное становление Brachycladiidae сопровождалось более серьезными перестройками: полной реорганизацией жизненного цикла (освоением не только новых окончательных, но и промежуточных хозяев) и изменением онтогенеза гермафродитного поколения (миниатюризацией и ювенилизацией церкарий и метацеркарий).

5.3 Эволюция жизненных циклов трематод из семейства Acanthocolpidae

Для того, чтобы наметить магистральное направление эволюции представителей Acanthocolpidae клады А, следует сопоставить данные о жизненных циклах акантокольпид с имеющимися молекулярно-филогенетическими реконструкциями.

Базальное положение среди Acanthocolpidae клады В занимает вид *Stephanostomum dentatum* (Рис. 2, 9; Bray et al., 2005; Fraija-Fernández et al., 2015; Krupenko et al., 2023), а его вторыми промежуточными хозяевами выступают исключительно донные рыбы — представители семейства камбаловые (Wolfgang, 1955; Мамаев и др., 1963; Køie, 1983). Примечательно, что у подавляющего большинства видов рода *Stephanostomum* метацеркарии также паразитируют в бентосных организмах: рыбах, головоногих и двустворчатых моллюсках. Наконец, подавляющее большинство церкарий *Stephanostomum* spp. не обладают морфологическими или поведенческими особенностями, которые можно было бы трактовать как адаптации для привлечения внимания второго промежуточного хозяина (Martin, 1939; Wolfgang, 1955; Madhavi, Shameem, 1993; Barnett et al., 2010).

Согласно имеющимся на текущий момент молекулярно-филогенетическим реконструкциям, внутри Acanthocolpidae клады А имеются две монофилетические группы, одна из которых представлена видами рода *Pleorchis*, а вторая — личинками *Cercaria capricornia* групп 1–3 и *Tormopsolus orientalis*. Положение рода *Neophasis* в пределах этой клады акантокольпид пока еще остается неразрешенным (Рис. 2, 9; Krupenko et al., 2023). При этом церкарии рода *Tormopsolus* и личинки *Cercaria capricornia* групп 1–3 обладают крупными размерами и расширенным постацетабулярным отделом тела, а также пигментацией. Кроме того, церкарии *Cercaria capricornia* групп 1–3 дополнительно снабжены вентральным килем и латеральными выростами (Bartoli, Gibson, 1998; Barnett et al., 2008; Barnett, Miller, 2018). Для этих же личинок *Cercaria capricornia* групп 1–3 характерно дискретное движение и принятие особой позы во время фазы покоя (Barnett et al., 2008). Все эти морфологические и поведенческие адаптации служат, как считается, для привлечения внимания второго промежуточного хозяина (Bartoli, Gibson, 1998; Barnett et al., 2008; Barnett, Miller, 2018). Его роль играют бентосные и бентопелагические рыбы-микрофаги, что было показано для видов рода *Tormopsolus* (Yamaguti, 1936; Bartoli, Gibson, 1998). Той же самой стратегии «подражания добычи» придерживаются и церкарии *Pleorchis* sp. Okw1, однако она реализуется за счет иных морфологических и поведенческих адаптаций: для этого вида характерно образование крупной агрегации из личинок, различающихся по своему строению (Krupenko et al., 2023).

В противовес всем этим сильно модифицированным личинкам, церкарии *N. oculata* обладают гораздо более «неспециализированным» внешним видом: меньшими размерами, отсутствием расширенного постацетабулярного отдела тела, пигментации, киля или латеральных выростов, имеющихся у личинок *Cercaria capricornia* групп 1–3 и *Tormopsolus orientalis*. Примечательно также, что метацеркарии *N. oculata* были зарегистрированы исключительно в рыбах, ведущих придонный образ жизни (Bray, Gibson, 1991). Эти особенности реализации жизненного цикла и морфологии церкарии сближают *N. oculata* с некоторыми представителями Acanthocolpidae клады В. Собрав эти факты воедино, мы можем предположить, что плезиоморфным состоянием для акантокольпид будет реализация жизненного цикла с участием бентосного второго промежуточного хозяина, рыбы, которую заражают церкарии, не обладающие какими-либо уникальными морфологическими адаптациями. Пример такого жизненного цикла в пределах Acanthocolpidae клады А мы наблюдаем у *N. oculata*. Дальнейшая эволюция внутри этого таксона трематод, по-видимому, была направлена в сторону освоения рыб-микрофагов — вторых промежуточных хозяев, а также, вероятно, сопровождалась постепенным переходом от заражения бентосных рыб к инфицированию обитателей бентопелагиали и пелагиали. Судя по всему, эти процессы происходили в пределах двух групп внутри Acanthocolpidae клады А независимо и на базе разных морфологических и поведенческих адаптаций церкарий.

5.4 Возникновение вторично диксенного жизненного цикла *Neophasis anarrhichae*

Церкарии *N. anarrhichae*, хотя никогда и не покидают моллюска-хозяина, все же сохранили большую часть провизорных органов, имеющих у родственного вида *N. oculata*, такие как железы проникновения, пигментированные и непигментированный фоторецепторы, хвост. Все это свидетельствует в пользу предположения, что *N. anarrhichae* берет свое происхождение от вида, обладавшего свободноплавающей личинкой, и что выпадение второго промежуточного хозяина из его путей циркуляции произошло вторично и относительно недавно (Køie, 1973; Bray, Gibson, 1991). При этом отсутствие у церкарий *N. anarrhichae* мукоидных цитонов, а также меньший размер пигментированных глаз однозначно свидетельствуют о потере морфологических адаптаций для осуществления трансмиссии и заражения второго промежуточного хозяина. Кроме того, в отличие от *N. oculata*, развитие особей гермафродитного поколения *N. anarrhichae* не останавливается на каком-то определенном этапе: церкарии превращаются в инвазионных для окончательного хозяина метацеркарий, а те, в свою очередь, могут становиться половозрелыми и приступают к яйцепродукции, все еще находясь в первом промежуточном хозяине. Таким образом, жизненный цикл этого вида потенциально способен реализовываться с участием только одного хозяина, моллюска.

Мы считаем, что ключевую роль в сокращении путей циркуляции и появлении вторично диксенного жизненного цикла в пределах рода *Neophasis* сыграл переход от дискретного морфогенеза гермафродитного поколения к непрерывному. В типичном триксенном жизненном цикле церкарии не способны напрямую заразить окончательного хозяина, а наличие второго промежуточного хозяина необходимо для прохождения целого ряда морфогенетических преобразований, в результате которых личинка и становится инвазионной. Однако как только церкария приобретает способность продолжать свое развитие и превращаться в метацеркарию все еще находясь внутри моллюска, потребность во втором промежуточном хозяине постепенно отпадает, а его функциональную роль берет на себя первый промежуточный хозяин.

Освоение видом *N. anarrhichae* новых окончательных хозяев — зубаток рода *Anarrhichas* Linnaeus, 1758 — вероятно связано с особенностями питания этих рыб, которые поедают, в том числе, беспозвоночных с твердым скелетом: моллюсков, иглокожих и ракообразных (Bray, 1987; Falk-Petersen et al., 2010). Примечательно, что первым промежуточным хозяином *N. anarrhichae* является только обыкновенный букцидум, в то время как близкородственные гастроподы рода *Neptunea* — нет. Такую строгую специфичность к первому промежуточному хозяину также можно объяснить через особенности питания окончательного хозяина. Так, в пищевом комке полосатой зубатки частота встречаемости останков гастропод *B. undatum* во много раз превышает встречаемость останков брюхоногих моллюсков рода *Neptunea* (Falk-Petersen et al., 2010). Это, в свою очередь, может быть обусловлено большей доступностью обыкновенного букцидума в качестве пищевого объекта.

Вторично диксенные жизненные циклы, возникшие в результате сокращения путей циркуляции, и в которых моллюск выполняет одновременно роль и первого, и второго промежуточных хозяев, известны в 11-ти семействах трематод: у отдельных видов Fellodistomidae, Gorgoderidae, Gymnophallidae, Lissorhiidae, Microphallidae, Monorchidae, Zoogonidae, а также всех изученных в этом отношении Cyclocoelidae, Eucotylidae, Hasstilesiidae и Leucochloridiidae (Bartoli et al., 2000; Poulin, Cribb, 2002; Pina et al., 2009). Существует устоявшееся предположение, что возникновение вторично диксенных жизненных циклов такого типа чаще всего связано с адаптацией к неблагоприятным абиотическим факторам (Галактионов, 2016). Именно поэтому сокращение путей циркуляции в случае представителей семейств Cyclocoelidae, Eucotylidae, Hasstilesiidae и Leucochloridiidae объясняют освоением наземно-воздушной среды обитания (Галактионов, 2016). Эволюционное распространение вторично диксенных жизненных циклов

среди трематод из семейства Microphallidae связывают с обитанием в высокоширотных литоральных сообществах (Galaktionov et al., 2012; Galaktionov, 2017; Galaktionov, Blasco-Costa, 2018). *Gymnophallus choledochus* Odhner, 1900, представитель семейства Gymnophallidae, переключается с триксенного жизненного цикла на диксенный в зимнее время года (Loos-Frank, 1969).

В отличие от перечисленных примеров, сокращение путей циркуляции в случае *N. anarrhichae* вряд ли можно трактовать как адаптацию, возникшую в ответ на постоянное воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Единственный промежуточный хозяин этого вида, брюхоногий моллюск *B. undatum*, обитает на достаточно широком диапазоне глубин, от нижней границы литорали и до 200 м и более (Golikov, 1968; Nielsen, 1974). Однако наиболее предпочтительной глубиной для этой гастроподы, по-видимому, является 20–30 м или даже 50–60 м (Valentinsson et al., 1999; Borsetti et al., 2018). Условия обитания в этой части сублиторальной зоны, в целом, достаточно постоянны, что исключает участие абиотических факторов в качестве стимула, приведшего к сокращению путей циркуляции в жизненном цикле *N. anarrhichae*.

Подводя итог, мы предполагаем, что становление вторично диксенного жизненного цикла *N. anarrhichae* было обусловлено приобретением непрерывного онтогенеза у гермафродитного поколения. При этом интенсивные взаимоотношения «хищник-жертва» между зубатками и обыкновенным букцинумом способствовали закреплению двуххозяинного цикла. Иными словами, сокращение путей циркуляции у *N. anarrhichae*, в отличие от всех прочих трематод с жизненными циклами подобного типа, было обусловлено воздействием скорее биотического, а не абиотического фактора.

Заключение

Особенности биологии трематод неизбежно приводят исследователей к необходимости изучения жизненных циклов этих паразитов. Получение таких данных становится тем более актуально, если мы пытаемся выявлять эволюционные закономерности как для отдельных таксонов трематод, так и для всей группы в целом. Результаты нашей работы стали первым шагом на пути к пониманию эволюции трематод надсемейства Brachycladioidea. Так, впервые полученные данные о промежуточных хозяевах представителей семейства Brachycladiidae позволили нам выяснить, что эволюционное становление этих паразитов морских млекопитающих сопровождалось кардинальными перестройками жизненного цикла. В свою очередь, переописание и верификация жизненных циклов двух видов Acanthocolpidae клады А дали нам возможность наметить вероятное направление эволюции жизненных циклов, стратегий заражения и морфологии церкарий в пределах этой группы трематод. Кроме того, полученные результаты расширили наши представления о причинах возникновения вторично диксенных жизненных циклов трематод.

Дальнейшее развитие нашей работы можно вести как минимум по двум основным направлениям. Во-первых, остро необходимы более глубокие молекулярно-филогенетические исследования, выполненные, например, с привлечением данных по митохондриальным геномам. Это позволит не только точнее установить положение группы Brachycladioidea на филогенетическом дереве трематод, но и однозначно реконструировать взаимоотношения внутри этого таксона. Во-вторых, крайне важны работы по переописанию и расшифровке жизненных циклов, которые позволят получить новый фактический материал о спектрах промежуточных хозяев, морфологии и поведении личинок Brachycladioidea. В первую очередь, это необходимо сделать для представителей Acanthocolpidae клады В, однако не менее актуальным будет выполнение таких исследований и для видов Acanthocolpidae клады А, и для видов семейства Brachycladiidae. В совокупности все это позволит не только детальнее осветить эволюционную историю Brachycladioidea, но и выйти на более общие вопросы, связанные с колонизацией

трематодами морских млекопитающих, а также освоением рыб в качестве второго промежуточного хозяина.

Выводы

1. Подтверждена гипотеза о принадлежности к семейству Brachycladiidae партенит и личинок из натицидных гастропод и двустворчатых моллюсков, ранее описанных как *Neophasis* spp. Они являются стадиями развития вида *Orthosplanchnus arcticus*, паразита настоящих тюленей и моржа. Еще один близкий *O. arcticus* вид брахикладиид также использует в качестве первого промежуточного хозяина гастроподу *Cryptonatica affinis*.
2. Жизненный цикл *Neophasis oculata* полностью соответствует схеме, характерной для Acanthocolpidae. Его первым промежуточным хозяином являются брюхоногие моллюски из семейства Buccinidae, вторым промежуточным и окончательным — морские рыбы. У вида *N. anarrhichae* единственным промежуточным хозяином выступает гастропода *Buccinum undatum*, а окончательным — зубатки рода *Anarrhichas*.
3. Acanthocolpidae и Brachycladiidae обладают принципиально разным набором хозяев в жизненном цикле: это гастроподы надсемейства Buccinoidea (Neogastropoda)—рыбы—рыбы у акантокольпид, и гастроподы семейства Naticidae (Littorinimorpha)—двустворчатые моллюски—морские млекопитающие у брахикладиид. Из этого следует, что эволюционное становление Brachycladiidae сопровождалось полной перестройкой жизненного цикла: включением не только новых окончательных, но и промежуточных хозяев.
4. Род *Neophasis* принадлежит Acanthocolpidae кладе А и, по-видимому, сохраняет плезиоморфные признаки данного таксона. На это указывают особенности жизненного цикла и морфологии церкарии *N. oculata*.
5. Основным направлением в эволюции строения церкарий Brachycladiidae была миниатюризация и ювенилизация. По сравнению с личинками Acanthocolpidae клады А, они обладают меньшими размерами тела, меньшим количеством циртоцитов, меньшим числом желез проникновения, собранными только в одну группу, и менее дифференцированным зачатком половой системы. Те же эволюционные тенденции, вероятно, могут быть характерны и для метацеркарий брахикладиид, также обладающих небольшими размерами тела и менее дифференцированными зачатками пищеварительной и половой систем органов, по сравнению с метацеркариями акантокольпид.
6. Магистральным направлением эволюции жизненных циклов Acanthocolpidae клады А был переход от бентосных рыб, вторых промежуточных хозяев, к бентопелагическим и пелагическим рыбам-микрофагам. Это сопровождалось изменением в морфологии и поведении церкарий, а также сменой стратегии заражения. Судя по всему, переход к стратегии «подражания добычи» произошел в эволюции Acanthocolpidae клады А как минимум дважды, независимо и на базе разных морфологических и поведенческих адаптаций личинок.
7. В развитии гермафродитного поколения *N. anarrhichae* со вторично диксенным жизненным циклом сохраняются практически все ценогенезы, характерные для вида *N. oculata*, обладающего триксенным жизненным циклом, что указывает на относительно недавнюю дивергенцию этих видов. При этом церкарии *N. anarrhichae* не способны покидать промежуточного хозяина, поскольку у них отсутствуют чехлообразующие железы и слабо развиты фоторецепторы.
8. Развитие гермафродитного поколения *N. anarrhichae* представляет собой непрерывный процесс, и в первом промежуточном хозяине оно не останавливается на каком-то определенном этапе, а может продолжаться вплоть до достижения червями половозрелости и начала яйцепродукции. Для этого вида потенциально возможна гомоксенная реализация жизненного цикла, с участием единственного хозяина, гастроподы *B. undatum*.

9. Основной предпосылкой сокращения путей циркуляции у *N. anarrhichae* стал переход к непрерывному онтогенезу у гермафродитного поколения предковой формы. Закреплению вторично диксенного жизненного цикла способствовали интенсивные взаимоотношения «хищник-жертва» между окончательным и промежуточным хозяевами (зубатками и обыкновенным букцинумом).

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. Krupenko, D. Possible progenesis in *Neophasis anarrhichae* (Nicoll, 1909) Bray, 1987 in the White Sea / D. Krupenko, G. Kremnev, V. Krapivin // Parasitology international. – 2019. Vol. 70. – P. 82–85.
2. Kremnev, G. First elucidation of the life cycle in the family Brachycladiidae (Digenea), parasites of marine mammals / G. Kremnev, A. Gonchar, V. Krapivin, O. Knyazeva, D. Krupenko // International Journal for Parasitology. – 2020. Vol. 50, N 12. – P. 997–1009.
3. Kremnev, G. Life cycle truncation in Digenea, a case study of *Neophasis* spp. (Acanthocolpidae) // G. Kremnev, A. Gonchar, V. Krapivin, A. Uryadova, A. Miroljubov, D. Krupenko // International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. – 2021. Vol. 15. – P. 158–172.

Публикации в прочих журналах, трудах, сборниках и материалах конференций:

1. Крупенко Д.Ю. Возможность прогенетического развития трематоды *Neophasis anarrhichae* в беломорских гастроподах *Vaccinium undatum* / Д.Ю. Крупенко, Г.А. Кремнев, В.А. Крапивин // Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция – Санкт-Петербург: Издательство «Лема» – 2018. – С. 129.
2. Кремнев Г.А. От рыб к морским млекопитающим, или куда нас привело изучение жизненного цикла трематоды *Neophasis oculata* (Trematoda: Digenea) / Г.А. Кремнев, А.Г. Гончар, В.А. Крапивин, Д.Ю. Крупенко // Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ— 2020: Всероссийская конференция – Санкт-Петербург: – 2020. – С. 21.
3. Кремнев Г.А. Как трематоды заражают морских млекопитающих: что об этом могут рассказать жизненные циклы паразитов и пищевые предпочтения их хозяев / Г.А. Кремнев, А.Г. Гончар, В.А. Крапивин, С.А. Илюткин, Д.Ю. Крупенко // Морские млекопитающие Голарктики: XI международная конференция: Международная конференция – Москва, он-лайн: – 2021. С. 51, 156.
4. Кремнев Г.А. Что представители рода *Neophasis* (Digenea: Acanthocolpidae) могут рассказать о причинах возникновения вторично двуххозяиных жизненных циклов трематод? / Г.А. Кремнев, А.Г. Гончар, В.А. Крапивин, А.А. Урядова, А.А. Миролубов, Д.Ю. Крупенко // Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ— 2022: Всероссийская конференция – Санкт-Петербург: – 2022. – С. 81.
5. Кремнев Г.А. Секрет эволюционного успеха трематод из семейства Brachycladiidae, паразитов морских млекопитающих / Г.А. Кремнев, А.Г. Гончар, В.А. Крапивин, О.А. Скобкина, А.А. Миролубов, К.И. Белолубская, Д.Ю. Крупенко // VII съезд паразитологического общества: итоги и актуальные задачи: Всероссийская конференция с международным участием – Петрозаводск: – 2023. С. 173–174.