

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

На правах рукописи

Жукова

Алина Александровна

Генетический полиморфизм трематод рода *Leucochloridium*

03.02.11 – паразитология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д. б. н., проф. Н. В. Цымбаленко

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1. 1. Характеристика трематод рода <i>Leucochloridium</i>	12
1. 1. 1. Жизненный цикл трематод рода <i>Leucochloridium</i>	13
1. 1. 2. Распространение трематод рода <i>Leucochloridium</i>	16
1. 1. 3. Особенности организации партенит трематод рода <i>Leucochloridium</i>	17
1. 2. Подходы к изучению генома и молекулярные маркеры, используемые для генотипирования трематод.....	25
1. 2. 1. Анализ кластера рибосомной ДНК	26
1. 2. 2. Анализ митохондриальной ДНК	32
1. 2. 3. Анализ тандемно повторяющихся последовательностей	33
1. 3. Филогения и система трематод	34
1. 3. 1. Системы построенные на основе морфологических и кариологических признаках.....	36
1. 3. 2. Филогенетические построения, основанные на использовании молекулярных маркеров.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2. 1. Объекты исследования и сбор материала	46
2. 2. Оборудование и материалы	46
2. 3. Сравнительно-морфологический анализ.....	49
2. 4. Молекулярно-генетический анализ	49
2. 5. Методы работы с нуклеотидными последовательностями	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	55
3. 1. Общее описание спороцист <i>Leucochloridium paradoxum</i> , <i>L. perturbatum</i> и <i>L. vogtianum</i>	55

3. 1. 1. Трематоды <i>Leucochloridium paradoxum</i>	56
3. 1. 2. Трематоды <i>Leucochloridium perturbatum</i>	59
3. 1. 3. Трематоды <i>Leucochloridium vogtianum</i>	61
3. 2. Создание банка ядерной ДНК трематод р. <i>Leucochloridium</i>	63
3. 2. 1. Характеристика исследуемых образцов ДНК.....	63
3. 3. Анализ ДНК трематод р. <i>Leucochloridium</i> с помощью случайных праймеров (RAPD-анализ)	64
3. 4. Анализ ДНК трематод р. <i>Leucochloridium</i> с помощью специфических праймеров	69
3. 4. 1. Дизайн специфических праймеров	69
3. 4. 2. Анализ нуклеотидных последовательностей рДНК трематод <i>Leucochloridium</i> sp.	74
3. 4. 3. Вторичные структуры последовательностей рРНК трематод рода <i>Leucochloridium</i>	78
3. 4. 4. Характеристика полиморфизмов нуклеотидных последовательностей, входящих в кластер генов рРНК трематод рода <i>Leucochloridium</i>	81
3. 5. Филогенетический анализ трематод рода <i>Leucochloridium</i>	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
ВЫВОДЫ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕКСТЕ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЕ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Класс Trematoda объединяет несколько тысяч видов, составляющих более 2500 родов (Gibson et al., 2002). Эта группа характеризуется наличием сложного жизненного цикла, связанного со сменой хозяев и чередованием гермафродитного и партеногенетических поколений. Наличие среди трематод опасных паразитов человека и экономически важных животных привлекает большой интерес к изучению различных аспектов биологии, систематики и физиологии этих гельминтов.

Среди прочих вопросов большую актуальность приобретает изучение признаков видовой идентификации трематод. Исторически для этого класса сложились две, почти независимые системы. При этом обе основаны на морфологических характеристиках представителей гермафродитной генерации. Первая из них – таксономическая – основана на морфологии марит. Начиная с Цедера и Рудольфа (Zeder, 1800), Рудольфи (Rudolphi, 1819) классификация постоянно усложнялась и многократно менялась, особенно заметно – в последние десятилетия – на основании молекулярно-генетических данных. Вторая система (не таксономическая) основана на строении, а в ряде случаев на поведении их личинок – церкарий и призвана обобщить знания об их многообразии (см.: Lühe, 1909). Однако далеко не все жизненные циклы трематод расшифрованы, поэтому соответствие церкарий видам марит известно в очень небольшом числе случаев. В результате для многих видов до настоящего времени используется двойное название – по церкариям и по маритам.

Одним из решений данной проблемы стало применение молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно провести идентификацию вида трематод на различных фазах жизненного цикла. Несмотря на очевидное достоинство молекулярно-генетических подходов, исследований полноразмерных кластеров генов дигеней относительно немного. Только в 2009 г. были расшифрованы полные последовательности ядерных геномов двух

представителей данного класса – возбудителей шистосоматоза человека *Schistosoma mansoni* и *S. japonicum* (Berriman et al., 2009; Liu et al., 2011).

В настоящее время широкое использование ядерных и митохондриальных маркеров в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях трематод позволяет разрабатывать на их основе системы для видовой идентификации различных представителей данного класса. Среди молекулярно-диагностических систем наиболее эффективными и чувствительными являются системы, основанные на ПЦР с локус-специфичными праймерами (Zarlenga & Higgins, 2001).

Иногда в распоряжении исследователей имеется материал, представленный только партенитами трематод – редиями и спороцистами. Провести видовую идентификацию по морфологическим признакам в большинстве случаев невозможно. Однако для некоторых видов название дано на основании морфологических признаков именно партенит. Ярким примером являются спороцисты рода *Leucochloridium*. Последние получили широкую известность благодаря уникальной мимикрии, выражающейся в способности формировать отростки, которые формой, окраской и движением имитируют личинок насекомых. Именно строение этих отростков и легло в основу видовой идентификации представителей рода *Leucochloridium* по партенитам. Основными объектами в данной работе стали трематоды *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*. Однако даже для этих видов до нашего исследования были предприняты лишь предварительные попытки проверить валидность морфологических признаков методами молекулярной генетики. Соответственно, доказательство видовых отличий в формировании морфологического разнообразия спороцист рода *Leucochloridium*, чрезвычайно актуально для анализа столь сложного биологического явления как жизненный цикл трематод.

Степень разработанности. В настоящее время в литературе имеются немногочисленные работы, которые содержат результаты генотипирования рДНК трематод рода *Leucochloridium* (Tkach, 2001; Casey et al., 2003; Olson et al., 2003;

Rzad et al., 2014). Представленные в публикациях нуклеотидные последовательности кластера рибосомных генов *Leucochloridium paradoxum* и *L. perturbatum*, зарегистрированы в GenBank, но не являются полноразмерными. Последовательности рДНК *L. vogtianum* не изучены.

Цель работы – изучение внутривидового генетического полиморфизма спороцист трематод рода *Leucochloridium*.

Основные задачи исследования:

1. Изучить морфологические особенности партенит трематод рода *Leucochloridium*.
2. Осуществить видовую идентификацию трематод рода *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов.
3. Получить нуклеотидную последовательность протяженного участка кластера генов рРНК трематод рода *Leucochloridium*.
4. Провести анализ филогенетических связей *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* с другими видами трематод.

Научная новизна. Все представленные результаты являются новыми. В нашей работе впервые определены нуклеотидные последовательности кластера рДНК: 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S трех видов трематод рода *Leucochloridium*, кодирующие функциональные последовательности рибосомных РНК, а также последовательности участков внутренних транскрибируемых спейсеров: 4444 п. н. для *L. perturbatum*, 4430 п. н. для *L. paradoxum*, а также 2163 п. н. для *L. vogtianum*. Полученные нуклеотидные последовательности аннотированы в GenBank и доступны для сравнения с новыми результатами секвенирования ДНК трематод рода *Leucochloridium*. На основании филогенетического анализа полученных последовательностей всех трех исследуемых видов между собой и с данными о первичной структуре подобных участков рДНК представителей других родов впервые были построены дендрограммы, позволившие определить их принадлежность к семейству Leucochloridiidae, входящему в состав надсемейства Brachylaimoidea.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование структурной организации генома трематод имеет практическое приложение в медицине и сельском хозяйстве при разработке экспресс-методов генотипирования возбудителей заболеваний человека и животных, а также для создания нового поколения лекарств и усовершенствования вакцин. Созданный банк ядерной ДНК трематод рода *Leucochloridium*, коллекция оригинальных специфических праймеров для кластера генов рРНК, а также уникальные электрофоретические профили амплификатов ДНК трех видов трематод рода *Leucochloridium*, полученные с помощью RAPD-анализа могут служить для проведения экспресс тестирования особей, принадлежащих к исследуемым в работе видам и, возможно, другим таксонам дигеней.

Методология и методы исследования. Методология исследования основывалась на получении и молекулярно-генетическом анализе нуклеотидных последовательностей кластера рибосомных генов трематод *Leucochloridium* sp. для выявления внутри- и межвидового полиморфизма, а также филогенетического положения этих организмов. Работа выполнена с привлечением морфологических, молекулярно-биологических, молекулярно-генетических методов: извлечение и описание спороцист, выделение и анализ хромосомной ДНК, RAPD-анализ, ПЦР-амплификация со специфическими праймерами участков рДНК, их очистка и секвенирование. С помощью специальных компьютерных программ проводили анализ полученных нуклеотидных последовательностей: выравнивание и поиск полиморфизмов, построение топологических схем вторичных структур транскриптов рДНК, филогенетические реконструкции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Основными морфологическими признаками для видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium* являются особенности формы и окраски покровов отростков спороцист партенит. При этом для вида *L. paradoxum* характерно наличие зеленого пигмента в тегументе спороциты, для *L. perturbatum* –

коричневого пигмента с участками светлых и темных чередующихся полос, а отростки спороцист *L. vogtianum* содержат пигмент желтого цвета и несут папилломообразные выросты.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* подтверждает адекватность традиционно используемых для видовой идентификации морфологических признаков.

3. Исследуемые виды имеют достоверные межвидовые различия в нуклеотидных последовательностях ITS1 и ITS2, а также особенностях вторичной структуры транскрипта ITS2. Внутривидовой полиморфизм в нуклеотидных последовательностях генов рибосомного кластера среди особей видов рода *Leucochloridium* отсутствует.

4. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей рДНК, а также анализ полиморфизмов, выявляемых с помощью случайных праймеров, позволяет достоверно идентифицировать и различать между собой представителей рода *Leucochloridium*. Данные алгоритмы могут быть использованы для верификации случаев множественного заражения моллюсков.

5. По результатам филогенетического анализа на основе участка ITS1-5.8S-ITS2 кластера генов рДНК подтверждена принадлежность рода *Leucochloridium* к семейству Leucochloridiidae, входящему в состав надсемейства Brachylaimoidea.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена на 42 образцах ДНК, полученных из индивидуальных спороцист: 28 – *L. paradoxum*, 13 – *L. perturbatum* и 1 – *L. vogtianum*. Достоверность обеспечена многочисленными повторами секвенирования маркерных участков, воспроизводимостью полученных результатов, а также использованием различных молекулярных и статистических методов для проверки полученных данных. Результаты кластерного анализа оценены с помощью бутстрэп-метода (1000 повторностей при узловом значении не менее 70). Обработка материала проведена с использованием современного оборудования для молекулярно-

генетических исследований, а также соответствующего программного обеспечения.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи (3 из которых входят в журналы из перечня ВАК), 13 тезисов (устных докладов, постерных сессий и при заочном участии в материалах конференций). Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на 5 Съезде Паразитологического общества России, (Новосибирск, 2013); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014); Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013); Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (2013); Международном симпозиуме "Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике" (Владивосток, 2015).

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность Н. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаеву и Е. Е. Прохоровой за обучение, всестороннюю поддержку и помощь в подготовке диссертации. Особые слова благодарности автор приносит за практические консультации, ценные советы и помощь в освоении молекулярно-генетических методов Г. А. Захарову, Г. Г. Хрисанфовой, Н. И. Абрамсон. Автор крайне признателен А. С. Токмаковой, Н. И. Юрловой, С. В. Шеховцову, К. В. Рожковану за поддержку и неоценимую помощь в подготовке работы.

Работа выполнена при поддержке: гранта Министерства образования «Развитие научного потенциала высшей школы», 2009 – 2011 гг.; гранта РФФИ «Экспрессия генов факторов защитных реакций легочных моллюсков», 2010 – 2012 гг.; гранта Министерства образования и науки РФ «Разработка методики экспресс-анализа зараженности легочных моллюсков», 2012 г.; гранта Министерства образования и науки РФ «Применение метода цитофлуориметрической экспресс-диагностики пресноводных моллюсков при выявлении инвазии трематодами, патогенными для человека и животных», 2013

г.; гранта Президента РФ для молодых ученых № МК-2935.2013.4 «Генетический полиморфизм моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata)», 2013 – 2014 гг.; проектной части Государственного задания Министерства образования и науки РФ «Изучение функциональной активности брюхоногих моллюсков» (Проект № 1278), 2014 – 2016 гг.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Трематоды являются одной из интенсивно изучаемых групп беспозвоночных. Интерес к ним обусловлен не только тем, что многие из них являются опасными паразитами человека и животных, но также и уникальным жизненным циклом. Особенность последнего заключается в его гетерогенности, а также в сложной системе морфологических, физиологических и поведенческих адаптаций сосальщиков на разных фазах его развития (как паразитических, так и свободноживущих). При этом особенно много нерешенных проблем связано с биологией и развитием партеногенетических поколений, представленных редиями и спороцистами. До настоящего времени остаются дискуссионными вопросы природы и механизмов размножения партенит; также во многом не выяснена роль различных факторов в регулировании их развития, взаимоотношений с организмом хозяина (включая преодоление иммунных реакций последнего) и многие другие.

Способность трематод кардинально изменять образ жизни в течение жизненного цикла, адаптируясь к жизни внутри различных хозяев (представленных как холоднокровными, так и теплокровными животными) и во внешней среде, должна приводить к возникновению механизмов регуляции экспрессии генома и способов реорганизации генетической информации. Несмотря на столь интересные и своеобразные аспекты биологии трематод, особенности организации генома трематод изучены очень слабо. Однако для решения перечисленных выше проблем в изучении трематод необходимо хорошее знание объекта. К сожалению моделей, разработанных с использованием современных методов и подходов относительно немного. В основном речь идет о видах, представляющих опасность для человека и животных (*Trichobilharzia ocellata*, *Bilharziella polonica* Kow. (Безр, Воронин, 2007), *Opisthorchis felineus*, *Clonorchis sinensis* (Shekhovtsov et al., 2010).

Трематоды рода *Leucochloridium* широко распространены в природе как паразиты широкого круга птиц, однако не относятся к числу паразитов актуальных для экономики. Поэтому, несмотря на широкую известность среди биологов своим жизненным циклом и, прежде всего, уникальными спороцистами, молекулярная генетика представителей этого рода остается относительно слабо изученной. Особенно много вопросов связано с партенитами этих видов. В данном разделе представлены сведения о трематодах, являющихся непосредственно объектами нашего исследования. Кроме этого рассмотрены основные подходы, используемые для кариологического и молекулярно-генетического изучения трематод, а также методы филогенетического анализа и полученные с их помощью данные.

1. 1. Характеристика трематод рода *Leucochloridium*

Первые упоминания о трематодах, принадлежащих к роду *Leucochloridium*, относятся к началу XIX века. Немецкий исследователь Рудольфи (Rudolphi, 1803) обнаружил марит этих паразитов в клоаке соловья (*Luscinia luscinia* L.) и назвал *Fasciola macrostoma*, переименовав впоследствии в *Distoma macrostomum* (цит. по Быховская-Павловская, 1951). Немного позднее, также в Германии, Аренс (Ahrens, 1810) описал партеногенетическую стадию жизненного цикла исследуемых дигеней. Спустя 25 лет Карус (Carus, 1835) предложил название для этих трематод – *Leucochloridium*. При исследовании моллюска *Succinea amphibian* он обнаружил в его глазных щупальцах пульсирующие ярко окрашенные спороцисты паразита.

В 1819 г. Рудольфи описал второй вид этого рода – *Distomum holostomum*, особи которого обнаружил в пастушке (*Rallus aquaticus*). В дальнейшем Монтичелли (Monticelli, 1888) выделил род *Urogonimus* и поместил в него *Distomum macrostomum*, как *Urogonimus macrostomum*. В начале прошлого столетия Похе (Poche, 1907), предложил вернуть роду название *Leucochloridium* Carus, 1835, определив в качестве типичного вида *L. macrostomum* (Rud.).

Соответственно подсемейство *Urogominidae* было переименовано им в подсемейство *Leucochloridiinae* (цит. по Быховская-Павловская, 1951).

Долгое время род *Leucochloridium* так и оставался сборным: разные авторы относили к нему различное количество видов. Так, К. И. Скрябин (1948) определял в составе данного рода 19 видов, И. Е. Быховская-Павловская (1951) – 10 видов, С. Ямагути (Yamaguti) – 47 видов, Макинтош (Macintosh, 1932) – 12 видов (см: Король, 2004). Каган (Kagan, 1952), основываясь на деталях строения половой системы гермафродитных марит, включил в состав рода *Leucochloridium* 6 видов. Однако, в большинстве работ, посвященных систематике рассматриваемого рода трематод, в качестве основного признака используются особенности формы и окраски отростков спороцист партенит этих организмов (Гинецинская, 1968).

Имеются литературные описания и большего числа видов трематод рода *Leucochloridium*. В целом, начиная с XIX-ого века, встречается представление более тридцати видов этого рода. Среди них: *Leucochloridium caryocatactis* (Zeder, 1800), *Leucochloridium holostomum* (Rudolphi, 1819), *Leucochloridium paradoxum* (Carus, 1835), *Leucochloridium vogtianum* (Baudon, 1881), *Leucochloridium problematicum* (Magath, 1920), *Leucochloridium cercatum certhiae* (McIntosh, 1927), *Leucochloridium japonicum* (Ishii, 1932), *Leucochloridium fuscostriatum* (Robinson, 1947), *Leucochloridium phragmitophila* (Быховская-Павловская, Дубинина, 1951), *Leucochloridium perturbatum* (Pojmanska, 1969) и др.

Следовательно, несмотря на многочисленные исследования в этом направлении, вопрос о видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium* до настоящего времени остается дискуссионным.

1. 1. 1. Жизненный цикл трематод рода *Leucochloridium*

Жизненные циклы трематод многообразны и очень пластичны, но структура их при этом подчиняется определенным закономерностям и строгим правилам. На протяжении жизненного цикла трематоды могут иметь от одного до четырех

хозяев. Тем не менее, последовательность основных этапов становления их жизненного цикла трактуется достаточно сходно. Вероятно, становление жизненного цикла началось с освоения в качестве первого (по времени) хозяина – моллюска и, что первичный цикл трематод был однохозяинным. Вторым появился дефинитивный хозяин – позвоночное животное, причем произошло это намного позднее (Галактионов, Добровольский, 1998).

Среди многочисленных вариантов жизненных циклов дигенетических сосальщиков, включающих кроме генеративных (мариты, партениты) разнообразные личиночные формы, выделяют схемы, в которых отсутствует стадия свободноживущей личинки – церкарии. Развитие полностью происходит в партенитах. К данному типу относятся и трематоды рода *Leucochloridium*.

Основная часть работ по изучению жизненного цикла трематод рода *Leucochloridium* посвящена исследованиям гермафродитного поколения этого паразита и относится ко второй половине XX-ого века (Robinson, 1947; Быховская-Павловская, 1951; Kagan, 1951, 1952; Rayski, Fahmy, 1962; Pojmanska, 1963; Bakke, 1976a, 1976b, 1978). Что касается партеногенетического поколения, то данные в этой области не столь многочисленны, к тому же большинство их опубликовано достаточно давно. (Woodhead, 1935, 1936; Pojmanska, 1967; Lewis, 1974; Bakke, 1982; Zdarska et. al., 1982; Hackman, Valovirta, 1995).

В жизненном цикле лейкохлоридиумов один промежуточный хозяин и один окончательный. Дефинитивным хозяином являются птицы – представители семейств Воробьиные (*Passeridae*), Фазановые (*Phasianidae*), Ржанковые (*Charadriidae*), Бекасовые (*Scolopacidae*), Пастушковые (*Rallidae*), Врановые (*Corvidae*), Стрижиные (*Apodidae*) и др. Мариты трематод развиваются в кишечном тракте (клоаке) птиц. Промежуточный хозяин этих сосальщиков – наземный моллюск *Succinea putris* (сукцинея или янтарка). Сукцинея поедает вместе с листьями растений экскременты зараженных птиц, заглатывая и яйца *Leucochloridium*. Заключение внутри яиц мирацидии вылупляются в кишечнике моллюска и, прободая стенку кишки, попадают в гепатопанкреас (Гинецинская,

1968). Здесь мирацидий, скорее всего, развивается в материнскую спороцисту. Далее развитие идет укороченным путем: внутри спороцисты сразу формируются бесхвостые личинки церкариумы, внешне очень похожие на взрослую форму. В процессе развития спороцисты в теле моллюска формируется стolon образующий большое количество отростков, распространяющихся по телу янтарки. Зрелые отростки проникают в щупальца улиток, сохраняя связь со столоном с помощью длинной узкой трубочки. Передача трематод окончательным хозяевам – птицам, облегчена ритмическими движениями спороцист. Пульсирующие спороцисты партенит выглядят как личинки насекомых – гусеницы, что увеличивает вероятность их склевывания птицами (Lewis, 1977). Существует предположение, что зараженные улитки, которым свойственен положительный фототаксис, становятся более заметными, а значит и более доступными для насекомоядных птиц. Крупные пернатые поедают зараженного моллюска целиком, в то время как мелкие склевывают только глазные щупальца. В дальнейшем щупальца моллюска регенерируют и в них проникают новые окрашенные отростки, развившиеся из материнской спороцисты (Wesenberg-Lund, 1931). Также были зафиксированы случаи прободения отростком спороцисты непосредственно тканей тела моллюска (Атаев, Токмакова, 2015). Это происходило при условии наличия большого количества зрелых отростков с мирацидиями в гепатопанкреасе, когда оба глазных щупальца уже заняты другими отростками спороцист. Таким образом, одна спороциста может повторно служить источником заражения для нескольких особей окончательного хозяина.

Экологическое поведение, морфологическое строение и окраска рассматриваемого паразита формировались в течение долгого времени под строгим контролем эволюционных механизмов. Жизненный цикл, не включающий стадию свободноживущей личинки, делает представленную паразитическую стратегию уникальной в своем роде. Именно поэтому трематоды рода *Leucochloridium* представляют собой превосходную модель для исследования в области эволюционной экологии, паразитологии и зоологии.

1. 1. 2. Распространение трематод рода *Leucochloridium*

Анализ литературных данных за последние два с половиной века показал, что географическое распространение трематод рода *Leucochloridium* весьма обширно (рис. 1).

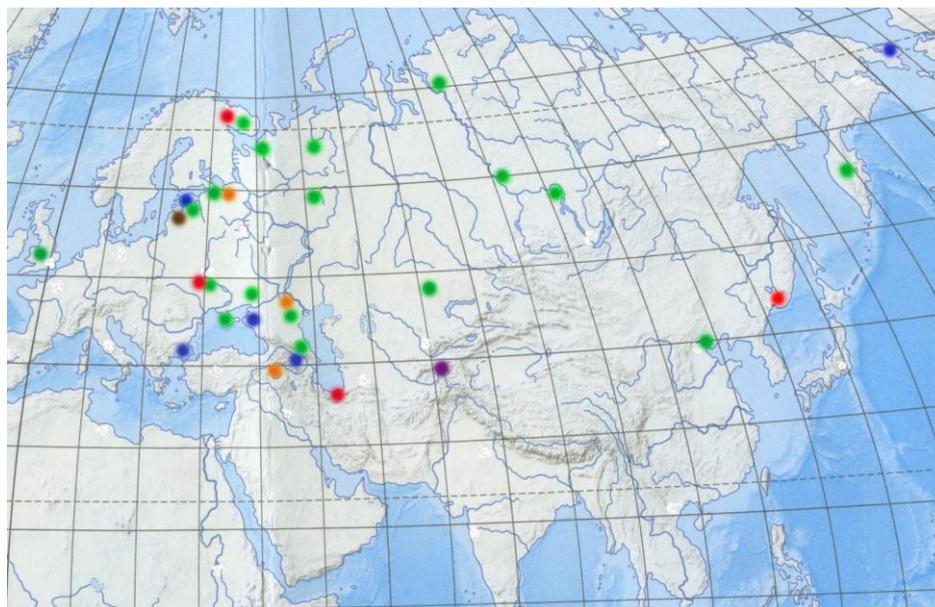


Рисунок 1. Распространение трематод рода *Leucochloridium* на территории Евразии.

Условные обозначения:

- *L. paradoxum*, ● *L. perturbatum*, ● *L. microburdata* (*L. phragmitophila*),
- *U. macrostomum*, ● *U. rossitensis*, ● *L. turoicum* (*L. holostomum*).

Ареал трематод рода *Leucochloridium* протянулся от Западной Европы (Франция, Дания) до Камчатки, и от Норвегии до Казахстана. Сведения о местах обитания трематод, относящихся к этому роду, описаны также учеными из Англии, Японии, Канады и США (Moss, 1995; Olson, 2003; Okuzaki, 2013). Столь широкое распространение этих паразитов объясняется, прежде всего, широким кругом видов птиц – дефинитивных хозяев *Leucochloridium*, а также их миграцией. Однако ареал является разорванным, так как его границы во многом определяются местами обитания моллюсков *Succinea* sp., которые являются для трематод рода *Leucochloridium* основными промежуточными хозяевами.

1. 1. 3. Особенности организации партенит трематод рода

Leucochloridium

Большая часть работ, посвященных трематодам рода *Leucochloridium*, содержит данные, полученные для видов *L. paradoxum* и *L. perturbatum*. Мариты этих видов имеют сходные морфологические характеристики, однако партениты сильно отличаются по форме, числу отростков спороцист, интенсивности окраски и характеру чередования темных полос на них. В тоже время, морфологически похожие спороцисты часто имеют отростки разные по цвету.

Спороцисты вида *L. paradoxum* имеющие отростки зеленой окраски, впервые были описаны в Германии (Carus, 1835), спороцисты *L. perturbatum* (syn. *L. actitis*) с коричневыми спороцистами – в Северной Америке (McIntosh, 1932), а спороцисты с непигментированными «пузырчатými» отростками *L. vogtianum* впервые были описаны во Франции (Baudon, 1881). Наиболее распространен в природе *L. paradoxum*, а наименее – *L. vogtianum*.

Строение спороцист. Первое функционально-морфологическое исследование спороцист трематод рода *Leucochloridium* с помощью электронной микроскопии показало, что спороцисты состоят из трех отделов: разветвленной центральной части, длинных тонких трубочек и цилиндрических отростков. Зрелые отростки пигментированы. Их дистальная часть закруглена, а основание слегка сужено. Размер и форма отростков могут изменяться в зависимости от их мышечного сокращения (Bakke, 1976).

В настоящее время установлено, что стolon спороцисты подразделяется на три морфофункциональные зоны: (1) центральная (репродуктивная) – разветвленная, локализована в гепатопанкреасе моллюска; (2) зона тонких трубочек, служащих для перемещения эмбрионов; (3) окрашенные отростки спороцисты, выполняющие функцию выводковых камер (Атаев и др., 2013).

Данные разных авторов относительно размеров отростков расходятся. Длина отдельных отростков спороцисты достигает 13 – 14 мм (Король, 2004); от 6.5 до 10.5 при ширине – 1.6 – 2.6 мм (Соболева, Осиповская, 1979); 7 – 12 мм при

ширине до 3 мм (Япринцева, 1986). Каждый из отделов имеет определенную локализацию в теле моллюска-хозяина, а также играет свою роль для организма в целом.

Показано, что стенка зрелых спороцист является сложной структурой, представленной наружной и внутренней (погруженной) частями, которые соединены между собой цитоплазматическими тяжами, и составляют единое целое – тегумент. Наружный слой тегумента – исчерченный неровный слой, лежащий на базальной мембране. На его поверхности отмечается гликокаликс типичного для спороцист трематод строения (Галактионов, Добровольский, 1998).

С внутренней стороны покровы отделяются волокнистым слоем – базальной мембраной самой стенки. Она имеет коллагеновую природу и окрашивается в синий цвет по Маллори, как и аморфное бесклеточное вещество, заполняющее полость спороцист. Такое окрашивание свойственно муциноподобному веществу. В строении стенки разных участков тела у всех типов зрелых спороцист наблюдаются различия (цит. по Начева, 1981).

Тегумент центральной части столона спороцисты, расположенной в гепатопанкреасе улитки, несет на своей поверхности отдельные разветвленные микроворсинки. Также в синцитиальной оболочке обнаружены многочисленные пузырьки, содержащие материал средней плотности и митохондрии. Базальная пластинка состоит из электронно-плотного материала. Основной слой мышц развит слабо. Цитоплазматические мостики, соединяющие синцитиальную часть тегумента с цитонами, содержат несколько микроканалцев и многочисленные пузырьки. Цитоны в свою очередь содержат круглые ядра, овальные митохондрии различных размеров, многочисленные пузырьки и хорошо развитую шероховатую эндоплазматическую сеть.

На поверхности системы трубочек микроворсинки гораздо более многочисленные и разветвленные. В тегументарном синцитии включений не наблюдается, но его внутренняя граница образует многочисленные инвагинации. Многочисленные продольные и циркулярные мышцы окружены фиброзным

материалом. Цитоны лежат под мышцами и содержат большие ядра округлой формы и митохондрии.

В области отростков микроворсинки расположены плотнее и характеризуются сильной разветвленностью. В тегументарном синцитии есть многочисленные крупные митохондрии с хорошо развитыми кристами и вакуоли различных размеров. Последние содержат три морфологических типа пузырьков: маленькие электронно-прозрачные пузырьки (диаметр 45 нм), большие электронно-прозрачные пузырьки (диаметр 79 нм), и пузырьки с плотным центром (диаметр 79 нм), который четко отделен от везикулярной мембраны.

Слой волокнистых элементов, лежащих в основе базальной пластинки, очень толстый. Цитоны содержат большое количество митохондрий, а в цитоплазматических мостиках содержатся многочисленные микротрубочки.

Наличие микроворсинок на поверхности и разнообразных включений в синцитиальной оболочке, таких как митохондрии, вакуоли, пузырьки, микротрубочки и другие структуры, отмечалось многими авторами как неотъемлемая часть, которая имеет метаболическое значение для этого слоя. Однако, в разных частях спороцисты отсутствуют структуры, которые могут свидетельствовать о пиноцитозном питании (Pojmanska, Machaj, 1991).

До сих пор нет никаких доказательств наличия нервной системы в спороцистах *Leucochloridium*. Тем не менее, хорошо известно, что ответвления реагируют на интенсивность света, температуры и механические импульсы (Mönnig, 1922; Halik, 1931; Lewis, 1977; Bakke, 1982; Pojmanska, Machaj, 1991).

Исследование Pojmanska и Machaj (1991) выявило два элемента нервной системы спороцист: сенсорный корешок, заканчивающийся в центральной части спороцисты, и нервные отростки, содержащие три вида везикул в тегументарном синцитии отростков.

Пигментация спороцист. Особый интерес исследователей вызывает яркая и разнообразная окраска отростков спороцист трематод рода *Leucochloridium* (Гинецинская, 1953, 1968; Pojmanska, 1967; Bakke, 1980). Различия в окраске

наблюдаются как в цвете, так и в рисунке распределения пигмента: кольцевые, либо продольные полосы, пятна и др. Цвет и распределение пигментных гранул имеют таксономическое значение (Bakke, 1980).

Ниже приведены примеры основных вариантов окраски отростков, предложенные разными авторами.

Вудхед выделил 4 основных варианта пигментации отростков спороцист (Woodhead, 1935):

(1) «Зеленая спороциста» (the green sporocyst). В передней части отростка выделяется участок ярко-зеленого цвета с небольшими красными пятнами округлой формы. Ниже расположены кольцевая и продольные полосы зеленого цвета, которые чередуются с белыми пятнами. На дистальном конце отростка имеются темно-красные или красно-коричневые «бородавки». В зависимости от возраста отростка, зеленый цвет может приобретать различные оттенки от изумрудного, сине-зеленого, нефритового до оливково-зеленого цвета.

(2) «Оранжевая спороциста» (the orange sporocyst). Пигментация этих отростков складывается из кольцевых полос темно-желтого, оранжевого и красно-коричневого цвета. На суженной проксимальной части отростка выделяются продольные полосы темно-оранжевого цвета, а на дистальном конце расположены многочисленные мелкие красно-коричневые бугорки («бородавки»).

(3) «Красно-коричневая спороциста» (the red-brown sporocyst). Дистальная часть такого отростка окрашена в красно-коричневый цвет. Ниже расположены чередующиеся кольцевые полосы белого, кремового и красно-коричневого цвета. С увеличением возраста происходит изменение окраски на темно-коричневую. По мнению Вудхеда данный тип пигментации отростка является наиболее часто встречающимся.

(4) «Коричневая спороциста» (the brown sporocyst). В первой трети отростка выделяется только одна яркоокрашенная кольцевая полоска коричневого цвета.

Т. А. Гинецинская по окраске отростков разделила спороцист рода *Leucochloridium* на 5 типов (Гинецинская, 1953, 1968):

(1) **Зеленая спороциста** (окраска совпадает с описанием, выполненным Карусом (Carus, 1835) для *L. paradoxum*).

(2) **Оранжевая спороциста** (соответствует описанной Вудхедом, – см. выше).

(3) **Желто-коричневая спороциста**: дистальная часть отростков коричневая, далее чередуются полосы белого, охристого и шоколадно-коричневого цвета. Пигментированная часть покровов несет несколько рядов белых пятен.

(4) **Буро-зеленая спороциста**: вершина отростков окрашена в бурый цвет, ниже переходящего в зеленый. Далее следуют желто-белое и бурое кольца. Пигментированная часть покровов покрыта рядами белых пятен.

(5) **Бородавчатая спороциста** (*L. vogtianum*): верхняя треть зрелых отростков спороцисты кофейного цвета с коричневыми и белыми пятнами. Непигментированная часть отростка спороцисты несет продольные ряды бородавчатых выростов, которые у вершины приобретают коричневую окраску.

В работах Л. В. Начевой с соавторами упоминается о спороцистах только трех видов без их описания (Начева и др., 1981):

(1) **Зеленая спороциста** *Leucochloridium paradoxum*.

(2) **Буря спороциста** *Leucochloridium problematicum*.

(3) **Буро-зеленая спороциста** (латинское название не указано).

Пигменты, которые придают цвет отростку спороцисты, распределены внутриклеточно в виде гранул (зерен) разной плотности в так называемых пигментных клетках (Bakke, 1982; Zdarska et al., 1982).

Пигментные гранулы различаются по цвету (болотисто-зеленые, оранжево-бурые, зеленые, коричневые) и форме (округлая, неправильная) (Bakke, 1982; Zdarska et al., 1982). Их накопление происходит преимущественно на концах (в концевых участках) цитоплазматических отростков пигментных клеток (Bakke,

1982). Гранулы могут сливаться и образовывать крупные «глыбки», заполняя весь тегумент (Начева, 1981).

Согласно данным Л. В. Начевой с соавторами распределение гранул обусловлено также взаимной адаптацией паразита и хозяина. Из ткани пищеварительной железы в спороцисту проникают питательные вещества, таким образом, нарушая питание самой железы. В свою очередь железа частично адаптируется к паразитированию и потребляет из стенки спороцисты вещества для поддержания жизнедеятельности. Авторы предполагают, что именно этими процессами можно объяснить накопление разных гранул пигмента в железе одного вида моллюсков в зависимости от вида *Leucochloridium*.

Интенсивность окраски полос и пятен на поверхности отростков спороцист, зависит от плотности распределения пигментных гранул. В тех частях стенки, где мало пигментных зерен, расположение полос более равномерно и менее интенсивно. В свою очередь скорость и количество накопленных гранул зависит от возраста отростков спороцисты (Pojmanska, 1967).

Клетки, ответственные за секрецию пигментов, окрашивающих отростки спороцист, локализируются в субтегументарном слое. В пигментных гранулах отсутствуют белки, липиды и углеводы. Одним из компонентов этих гранул являются желчные пигменты (Ataev et al., 2013).

Согласно результатам гитохимического исследования представителей трематод других родов (*Cercaria buchanaui*, *Catantropis johnstoni*, *Cloacitrema michiganensis* и др.), роль пигмента у них может принадлежать β -каротину и в отдельных случаях дериватам хлорофилла (Nadakai, 1960). Фрид с соавторами при определении природы пигмента предположили наличие в составе пигментных гранул липидов, в расчете на то, что они относятся к каротиноидам (Fried et al., 1993, 1995). Однако с помощью метода тонкослойной хроматографии им удалось определить отсутствие пигментных составляющих среди липидных бэндов. После чего они пришли к выводу, что пигмент является водорастворимым веществом или флавоноидом.

По наблюдениям других авторов пигментация отростков спороцисты *Leucochloridium* возникает лишь под действием дневного света после того, как они проникают в прозрачные щупальца моллюска (Mönnig, 1922; Wesenberg-Lund, 1931; Pojmanska, 1967; Bakke, 1982). Также предполагается, что пигментные клетки могут иметь центральное функциональное значение в физиологических реакциях спороцист, например, для пульсаций отростков (Lewis, 1977).

Размножение спороцист рода *Leucochloridium* до последнего времени было практически не изучено. В настоящее время признается, что размножение партенит трематод осуществляется с помощью специальных органов – герминальных масс (ГМ). Термин «germ masses» предложил в 1930 году Брукс для обозначения образований, в которых происходит мультипликация генеративных клеток. В дальнейшем подобные центры были обнаружены в партенитах различных видов, однако отношение к их природе долго оставалось дискуссионным. Только в последнее время ГМ стали рассматривать как гомологи яичников мариит (см.: Dobrovolskij, Ataev, 2003). Однако вторично ГМ стали полифункциональными органами. Здесь осуществляются такие процессы, как пролиферация недифференцированных клеток (НК), дифференциация части из них в генеративные (ГК), дробление последних, а также начальные этапы эмбриогенеза.

ГМ спороцист рода *Leucochloridium* расположены в центральной зоне столона и представлены молодыми, зрелыми и дегенерирующими ГМ. Молодые ГМ содержат недифференцированные клетки (способные к пролиферации) и генеративные клетки, в результате дробления которых в зрелых ГМ формируются эмбрионы метацеркарий. После реализации репродуктивной функции наблюдается дегенерация ГМ (Атаев и др., 2013).

Эти данные подтверждают мнение, что размножение спороцист трематод рода *Leucochloridium* приурочено к центральной зоне столона. Именно она производит эмбрионы, которые затем проходят через узкую трубочку в отростки, где они хранятся и развиваются в инвазионную стадию (Bakke, 1980; Pojmanska,

Machaj, 1991). Однако некоторые исследователи приводят данные о локализации незрелых церкариумов (=метацеркарии) в противоположном конце от отростков тела зрелой спороцисты. Стенка в этом месте утолщена и содержит большое количество клеток (Начева, 1981). По мнению Т. А. Гинецинской бесхвостые церкарии формируются прямо внутри зрелых окрашенных отростков (Гинецинская, 1968).

Зрелые отростки содержат большое количество метацеркарий. Суммарное число личинок не совпадает по результатам подсчетов различных авторов: свыше 100, иногда свыше 200 метацеркарий (Rojmanska, 1967); до 150 личинок (Король, 2004); до 35 экземпляров (Соболева, Осиповская, 1979).

В молодых, неокрашенных отростках могут находиться метацеркарии, находящиеся на разных стадиях развития. В зрелых отростках метацеркарии уже сформированы и окружены оболочкой, плотность которой определяется степенью зрелости самой метацеркарии. Ряд авторов называют оболочку цистой и говорят о том, что зрелые метацеркарии покрыты менее плотными цистами, чем молодые (Соболева, Осиповская, 1979). Другие, напротив, утверждают, что оболочка тонкая и прозрачная у молодых экземпляров и с возрастом она утолщается, темнеет и становится непрозрачной. Оболочки зрелых метацеркарий коричневатые и непрозрачные (Rojmanska, 1967). Э. Н. Король в свою очередь говорит о слое гликокаликса, который только внешне напоминает цисту, но в отличие от последней в нем имеется три отверстия: ротовое, воронка брюшной присоски и экскреторное (Король, 2004). Плотность слоя гликокаликса, по его мнению, также, как и плотность цисты, зависит от степени зрелости метацеркарий – зрелые метацеркарии покрыты слоем гликокаликса светлого цвета, молодые – темным. Тем не менее, к настоящему времени природа этой оболочки остается малоизученной. Она окрашивается в малиновый цвет по Маллори, что может свидетельствовать о наличии небольшого количества углеводов (Начева и др., 1983).

Размеры метацеркарий в пределах одного отростка могут варьировать. Средняя длина тела метацеркарии составляет 1.10 мм при ширине 0.37 мм. (Король, 2004).

1. 2. Подходы к изучению генома и молекулярные маркеры, используемые для генотипирования трематод

Генотипирование организмов является одним из обязательных этапов исследований в области систематики и филогении. Общие принципы построения геномов (ядерной и митохондриальной ДНК) паразитических червей, а также особенности их структурно-функциональной организации в группах различного таксономического ранга позволяют предсказывать и идентифицировать их функционально важные области и выяснять общие закономерности происхождения генетического полиморфизма и биоразнообразия.

С точки зрения структурной организации и эволюции генома, трематоды до сих пор остаются малоизученными. Одними из первых полные нуклеотидные последовательности ядерных ДНК представителей этого класса определили Берриман и Лиу (Berriman et al., 2009). Анализ этих последовательностей позволил выявить ряд особенностей в геномах возбудителей шистосоматоза человека – *Schistosoma mansoni* и *S. japonicum*. Так, по сравнению с геномами других беспозвоночных они имеют относительно большой размер и низкую частоту генов. Кроме того, показано, что в протеоме *S. japonicum* отсутствует около 4000 белковых доменов, характерных для других многоклеточных организмов. Предполагается, что утрата около 1000 из этих доменов может быть отчасти обусловлена приспособлением к паразитическому образу жизни.

Популярным также является анализ последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК), так как такие последовательности являются высоко полиморфными, что делает их удобным маркером для популяционных исследований. Наряду с мтДНК для изучения филогений животных наиболее часто используют гены рРНК, а также неконсервативные последовательности,

разделяющие индивидуальные гены рРНК, называемые внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS) и наружными, или межгенными спейсерными последовательностями (IGS). Сравнительный анализ филогенетических возможностей ядерных и митохондриальных генов на уровне таксонов высокого ранга показал, что ядерные экзоны более подходят для этих целей, чем гены мтДНК (Springer et al., 2001). Несмотря на это, ядерные последовательности реже используют в филогенетических исследованиях, чем митохондриальные из-за трудностей с их выделением из больших и сложных эукариотических геномов. Как правило, для разных видов изучены последовательности разных генов. Это делает межвидовые сравнения фактически невозможными (Банникова, 2004).

Результаты филогенетического анализа базируются на структурных особенностях конкретных молекулярных маркеров. Так, кодирующие последовательности ДНК, гены, прямо связаны с фенотипом. Соответствующие им признаки отражаются на приспособленности организма, поэтому последовательности кодирующих генов изменяются медленнее некодирующих последовательностей и подвержены конвергентной эволюции, что, разумеется, отражается на реконструированных на их основе филогенетических деревьях.

1. 2. 1. Анализ кластера рибосомной ДНК

Наиболее используемыми в молекулярных исследованиях трематод являются нуклеотидные последовательности рибосомного кластера (рДНК). Уникальная структурная и функциональная организация этого участка генома обуславливает разную скорость эволюции его структурных элементов (Bowles et al., 1993). Сравнительный анализ молекулярно-генетической изменчивости этой части генома эукариот многие годы используется в качестве удобного инструмента для понимания закономерностей эволюционного процесса (Hillis et al., 1996; Forterre et al., 2002).

У большинства эукариотических организмов кластер рДНК состоит из tandemно повторенных генов рибосомных РНК (18S, 5.8S, 28S). Как правило, кодирующие области генов 18S-, 5.8S- и 28S- рРНК эукариот сгруппированы в указанном порядке в одну транскрипционную единицу (Gerbi et al. 1987). Таким образом, все три рРНК образуются из длинного транскрипта-предшественника в результате процессинга, включающего расщепление РНК эндонуклеазами и метилирование как нуклеотидов, так и 2'-гидроксильных групп.

Полная транскрипционная единица содержит два некодирующих спейсера – внутренние транскрибируемые спейсеры (internal transcribed spacers, ITS1 и ITS2), которые разделяют три кодирующие области, а также имеет некодирующие участки, расположенные перед первым геном, 18S рРНК, и за последним геном, 28S рРНК, которые называются внешними транскрибируемыми спейсерами (external transcribed spacers, ETS1 и ETS2) и межгенный, или нетранскрибируемый спейсер (intergenic spacer, IGS, nontranscribed spacer, NTS) (рис. 2).

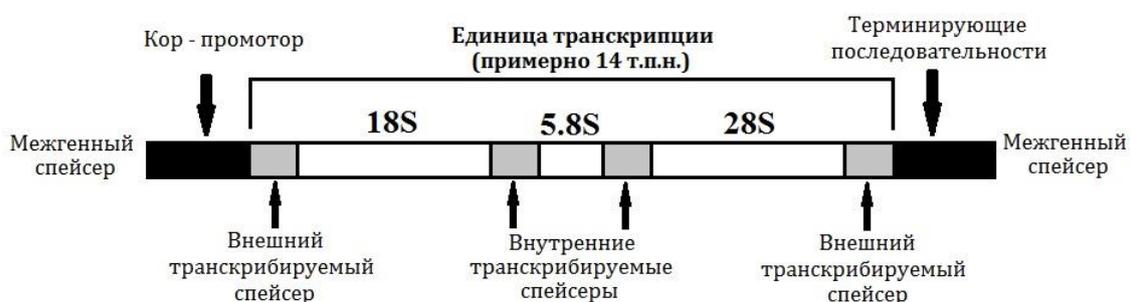


Рисунок 2. Организация кластера рДНК эукариот.

Условные обозначения: межгенный спейсер – NTS; внешние транскрибируемые спейсеры – ETS1 и ETS2; внутренние транскрибируемые спейсеры – ITS1 и ITS2.

Описанные структурные элементы рДНК обладают различной степенью эволюционного консерватизма. Наиболее вариабельными являются спейсерные последовательности.

Длина и состав нуклеотидной последовательности рРНК эукариот варьируют весьма незначительно, так что межвидовые различия по размеру транскрипционной единицы обуславливаются различиями в длине, а также

нуклеотидном порядке и составе спейсерных участков. Сегменты ДНК, расположенные на 5'-конце ETS по обе стороны от сайта инициации транскрипции важны для инициации транскрипции РНК-полимеразой I. В отличие от очень консервативных кодирующих областей для этих последовательностей характерно сильное видовое различие. Возможно, такие различия связаны с видоспецифичной активностью РНК-полимеразы I, которой для взаимодействия с этими последовательностями необходимы видоспецифичные факторы транскрипции (Moss, Stefanovsky, 1995).

Кластер рДНК представляет собой удобную модель для анализа механизмов изогенизации («согласованной» эволюции) членов мультигенного семейства. Основные генетические процессы, лежащие в основе изогенизации, были описаны на примере рДНК большого числа видов эукариот (Hillis, Dixon, 1991). Несмотря на общее сходство молекулярно-генетической организации рДНК эукариот, каждый вид обладает рядом структурных и функциональных особенностей, характерных для данного участка генома. Для комплексного понимания всего разнообразия генетических процессов, лежащих в основе функциональной активности и эволюционной изменчивости живых организмов, необычайно важным является изучение новых, ранее не исследованных видов, то есть традиционно не являющихся «модельными».

Наиболее эволюционно консервативны нуклеотидные последовательности, кодирующие непосредственно структуру рибосомных РНК (18S, 5.8S и 28S) – их сравнительный анализ эффективен при изучении генетических дистанций между эволюционно отдаленными таксонами. Внешние и внутренние транскрибируемые спейсеры (ETS1 и ETS2, ITS1 и ITS2 соответственно) эволюционируют более активно – их сравнительный анализ эффективен при исследовании филогенетических взаимоотношений между близкородственными видами. Наибольшее распространение в качестве маркера рДНК получила благодаря возможности разработать универсальные праймеры для консервативных участков кластера генов рРНК, фланкирующих более переменные последовательности.

Такие праймеры, подходящие для рДНК разных классов, типов и даже царств живого, позволяют исследовать молекулярную структуру совершенно неизученных организмов. Кроме того, рДНК представленная тандемными повторами кластера генов рРНК, характеризуется наличием участков, способных к формированию вторичных структур, особенности которых также могут быть использованы для изучения филогенетических отношений (Coleman, 2007). Следовательно, получение данных по полному составу кластера рибосомных генов трематод открывает новые возможности для дальнейшего изучения эволюционных закономерностей молекулярной организации этих паразитов.

Именно нуклеотидные последовательности рДНК стали первыми молекулярными маркерами для видовой идентификации трематод, изучения их популяционной структуры их видов и распространения. Так, исследование полиморфизма ITS2 позволило найти различия между географическими выборками *Paragonimus westermani* из южной и северо-восточной частей Азии, обладающие специфичностью к разным видам моллюска-хозяина. Это позволило выделить внутри одного вида два новых (Iwagami et al., 2000). При дифференциации криптических видов трематод морских рыб из рода *Cainocreadium* (Oprescoelidae) морфологическая и молекулярно-генетическая классификация с использованием полиморфных последовательностей ITS совпали (Jousson, Bartoli, 2001).

RFLP-анализ (restriction fragment length polymorphism – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) фрагмента ITS2, позволил получить видоспецифичные паттерны фрагментов, благодаря которым удалось осуществить видовую идентификацию двух близких и морфологически схожих видов – *Schistosoma haematobium* и *S. bovis*. Данный способ оказался удобным для идентификации церкарий этих шистосом, извлеченных непосредственно из моллюска, а также из проб воды (Barber et al., 2000).

Изменения в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК могут быть использованы для обнаружения криптических видов

трематод, особенно в тех случаях, когда соответствующие виды отличаются специфичностью по отношению к хозяину или по другим биологическим характеристикам. Например, для детекции спорозист *S. mansoni* в промежуточном хозяине была разработана система «гнездовой» ПЦР с праймерами, специфичными к фрагменту 18S рДНК (Hanelt et al., 1997). Использование ITS-региона, включающего ITS1, 5.8S рДНК и ITS2, позволило успешно дифференцировать церкарий трех видов птичьих шистосом: *Trichobilharzia szidati*, *T. franki*, *T. regenti* (Dvorak et al., 2002; Rudolfova et al., 2007).

В 2014 году ученые из Бразилии опубликовали результаты исследования в области палеопаразитологии, впервые полученные с помощью молекулярно-генетических методов. Анализируя небольшие участки (≈ 125 п.н.) последовательностей ITS1 (рДНК) и *cox1* (мтДНК) они идентифицировали эхиностоматид в археологических образцах копролитов человека. Идентифицировать трематод до вида не удалось, но конкретные фрагменты ДНК четко определили как принадлежащие к роду *Echinostoma* (Leles et al., 2014).

Высокая степень согласованности результатов филогенетических исследований, полученных с помощью молекулярно-генетических методов с известными морфологическими данными, достигается при достаточно внимательном и педантичном подходе. Так, в монографии «Biology of Echinostomes» приводятся данные по изучению четырех родов трематод: *Echinostoma*, *Echinoparyphium*, *Hypoderaeum* и *Isthmiophora*. Полученные последовательности ND1 и ITS послужили основой для построения филогенетического дерева, которое имело высокую статистическую поддержку ветвей, а также согласовывалось с данными, основанными на морфологическом анализе (Fried; Toledo, 2009). Ученые из Южной Америки использовали для идентификации новых видов *Auriculostoma* участки рДНК, кодирующие 28S рРНК и ITS2 (Razo-Mendivil et al., 2014). Различия между родами трематод на участке, кодирующем 28S рРНК, составили от 2.4% до 6.3%, а между видами трематод на участке ITS2 составили 2.0% – 3.6%. Таким образом, молекулярно-

генетический анализ подтверждает результаты морфологического исследования, выполненного методом электронной микроскопии, и говорит о дифференциации на два вида: *Auriculostoma totonacapanensis* и *A. astyanace*.

Использование высококонсервативного участка 18S рДНК в качестве маркера при определении групп высокого таксономического ранга, таких как Platyhelminthes, описано в работе британских ученых (Baverstock et. al., 1991). Образцами служили ДНК плоских червей, относящихся к различным классам и семействам: *Spirometra erinacei* (Pseudophyllidea: Diphyllbothriidae), *Acanthobothrium heterodonti* (Tetraphyllidea: Oncobothriidae), *Austramphilina elongata* (Austramphilinidae), *Gyrocotyle rugosa* (Gyrocotylidae), *Dictyocoryle coeliaca* (Monopisthocotylidea: Monocotylidae), *Diclidophora merlungi* (Polyopisthocotylidea: Diclidophoridae), *Calicophoron calicophorum* (Paramphistomoidea: Paramphistomidae), *Temnocephalu dendyi* (Temnocephalidae), *Notoplana austris* (Acotylea: Leptoplanidae). В результате были получены весьма противоречивые данные о положении Temnocephalida, монофилетичности моногеней и группы *Gyrocotyle*. Спустя 8 лет Monogenoidea по данным 18S была признана монофилетичной (Littlewood, Rohde, 1999). Одновременно, классические схемы, предложенные Эхлерсом (Ehlers, 1985, 1986) и Бруксом (Brooks, 1985, 1989) подтвердились молекулярно-генетическими данными.

В 2011 году в Канаде вышла статья, посвященная филогенетическому анализу трематод семейств Diplostomidae и Strigeidae с помощью молекулярно-генетических методов. В работе использовали четыре маркерных участка: SSU (small subunit), LSU (large subunit), ITS (internal transcribe spacer) и *cox1* (cytochrome oxidase I). Авторы статьи сравнивают полученные закономерности с данными морфо-биологических исследований из литературных источников. В результатах указано, что четырнадцать родов диплостоматид и стригеид представляют собой монофилетическую линию. Сведения, имеющиеся в литературе о парафилитических отношениях исследуемых групп, не были поддержаны и требуют дополнительных данных (Lapierre, 2011).

1. 2. 2. Анализ митохондриальной ДНК

Митохондриальная ДНК животных, как вторая составляющая их генома представляет особый интерес, так как содержит небольшой набор генов, среди которых есть последовательности, кодирующие белки, рибосомные и транспортные РНК, а также некодирующие участки (D-петля). Это позволяет выбирать маркеры с разной скоростью эволюции, а также использовать и такие структурные признаки, как расположение друг относительно друга и ориентация генов, особенности вторичной структуры функциональных РНК. Такое разнообразие маркеров способствуют решению различных филогенетических и филогеографических задач, в том числе и при изучении трематод.

Митохондриальные маркеры успешно используются для детекции одних из наиболее опасных паразитов человека – шистосом. Так, использование ПЦР со специфическими праймерами, к участку мтДНК позволяет идентифицировать *Schistosoma mansoni* в промежуточном хозяине (Jannotti-Passos et al., 2006).

Данные о молекулярной структуре участков митохондриальной ДНК, кодирующих *nd1* (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1) и *cox1* (cytochrome C-oxidase subunit) и информация о последовательностях нуклеотидов участков ITS1 и ITS2 кластера рибосомных генов ядерной ДНК послужили основанием для построения филогенетических связей пяти видов эхиностоматид: *Echinostoma n. sp.*, *E. miyagawai*, *E. paraulum*, *E. bolschewense*, и *E. revolutum* (Kostadinova et al. 2003). Помимо этого, авторы продемонстрировали соответствие между морфологической и молекулярной идентификацией исследуемых видов (Fried, 2009). Следует отметить, что в одной из последних публикаций этой группы исследователей изложены результаты их работы, полученные за последние 15 лет в области молекулярной систематики дигенетических сосальщиков. Филогенетический анализ проводился на основании сравнения нуклеотидных последовательностей 18S и 28S. В результате были пересмотрены статусы некоторых таксонов высоких рангов трематод. Показан высокий уровень

корреляции данных, полученных в результате молекулярно-генетических и морфологических исследований соответственно (Kostadinova, Pérez-del-Olmo, 2014).

Данные о структуре ядерных и митохондриальных маркеров позволили охарактеризовать трематод семейства Opisthorchiidae (тип Platyhelminthes). Это семейство включает в себя паразитов почти всех классов позвоночных, главным образом млекопитающих и птиц. Генотипирование по маркерам митохондриальных генов *cox3*, *atp6* и *nd5* и совместно с несколькими хромосомными маркерами позволило реконструировать филогенетические отношения между несколькими видами этого семейства: *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Metorchis bilis*, *M. xanthosomus* и *Pseudamphistomum truncatum*. Анализ полных митохондриальных геномов позволил осуществить масштабное исследование генетической изменчивости *O. felineus* (Shekhovtsov et al., 2009; 2010).

1. 2. 3. Анализ тандемно повторяющихся последовательностей

Для определения до уровня рода, а также видовой идентификации трематод широко используют системы, разработанные на основе различных тандемно организованных повторов. Высокая частота представленности в геноме повторяющихся последовательностей делает возможным разработку чувствительных методов детекции, базирующихся на использовании ПЦР.

В частности, на основе тандемного повтора Sml-7 разработан способ детекции свободноплавающих церкарий *Schistosoma mansoni*, а также инфицированных моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Hamburger et al., 1998; Hamburger et al., 1998; Hertel et al., 2004). Кроме того, праймеры, разработанные на основе данного повтора, позволяют также детектировать яйца *S. mansoni* в образцах фекалий инфицированных людей (Pontes et al., 2002).

Другой тандемный повтор (Dral) является потенциально пригодным для детекции церкарий пяти видов *Schistosoma* (*S. bovis*, *S. magrebowiei*, *S. mattheei*, *S.*

curassoni и *S. intercalation*) (Hamburger et al., 2001), тогда как детекция моллюсков, инфицированных *S. haematobium*, основана на использовании видоспецифичного повтора Shi 10 (Abbasi et al., 2007).

Для детекции возбудителей церкариального дерматита человека – птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* разработаны две ПЦР-системы. В одной из них используются праймеры, специфичные к звену tandemно организованной последовательности ToSau3A, имеющей размер 396 п. н. (Hertel et al., 2002). Показано, что данный повтор является родоспецифичным и составляет около 1.5% генома церкарий *T. ocellata*, 1% – *T. franki* и 2% – *T. regenti*. С его помощью можно детектировать шистосом рода *Trichobilharzia* на стадии промежуточного хозяина, а также в пробах воды.

Вторая предложенная система родовой диагностики трихобильгарций разработана на основе повторов в составе ядерного генома у трех европейских видов. Лocus-специфичные праймеры подобраны к одному из клонированных RAPD-фрагментов генома *T. franki*, имеющему высокое сходство в аминокислотных последовательностях с ревертазным доменом одного из мобильных элементов шистосом млекопитающих (Korsunen et al., 2010).

1. 3. Филогения и система трематод

С появлением методов молекулярного анализа началось накопление данных по строению геномов плоских червей и использование этих данных для филогенетических целей. Приложение молекулярных методов к филогенетическим построениям в некоторых группах обнаружило достаточно близкое сходство реконструированных деревьев со схемами, полученными классическими сравнительно-морфологическими методами. Однако во многих таксономических категориях появление новых подходов выявило проблему соотношения молекулярных и сравнительно-морфологических данных в филогенетике. Анализ молекулярных данных ведется статистическими методами, по сути сходными с методами кладистического анализа морфологических

признаков, которые также вошли в обиход филогенетиков. В последние годы все филогенетические построения *Platyhelminthes* строятся на комплексном использовании молекулярных данных с наложением матрицы морфологических признаков (Корнакова, 2009).

Как уже отмечено выше, в течение жизненного цикла трематоды претерпевают морфологические, биохимические и физиологические изменения. Причем в организме первого промежуточного хозяина – моллюска – они интенсивно размножаются партеногенетическим способом, копируя тем самым унаследованные признаки по соответствующему набору генов. Процессы полового размножения и тем самым генетической рекомбинации происходят у гермафродитных взрослых особей – марит. На различных этапах онтогенеза у дигенетических сосальщиков включаются специфические сайты активности генетического материала, т.е. существуют зависящие от стадий развития активные ДНК последовательности (цит. по Nara et al., 1990). Однако, существуют и высоко консервативные участки ДНК, проанализировав которые можно сделать вывод о том или ином таксономическом ранге группы организмов. Основные предпосылки расхождения морфологических и молекулярных реконструкций заключаются в том, что на морфологическом уровне проявляется только малая часть геномов. В случае же молекулярных данных в анализ включается большое количество «молчащих», фенотипически не проявляющихся нейтральных мутаций нефункциональных участков генома, в большей степени подверженных параллельной и конвергентной эволюции (Gatesy et al., 2001).

Очевидно значение данных по первичной структуре различных участков ДНК трематод, которые существенным образом способствует решению целого ряда актуальных вопросов гельминтологии, заключается в систематике и эволюции этих паразитов.

1. 3. 1. Системы, построенные на основе морфологических и кариологических признаков

До конца 80-х годов прошлого века филогенетика плоских червей опиралась на классические сравнительно-морфологические методы и оперировала данными световой и электронной микроскопии. Так, в 1974 году Кэйблом была предложена ставшая классической схема филогенетических взаимоотношений трематод (рис. 3).

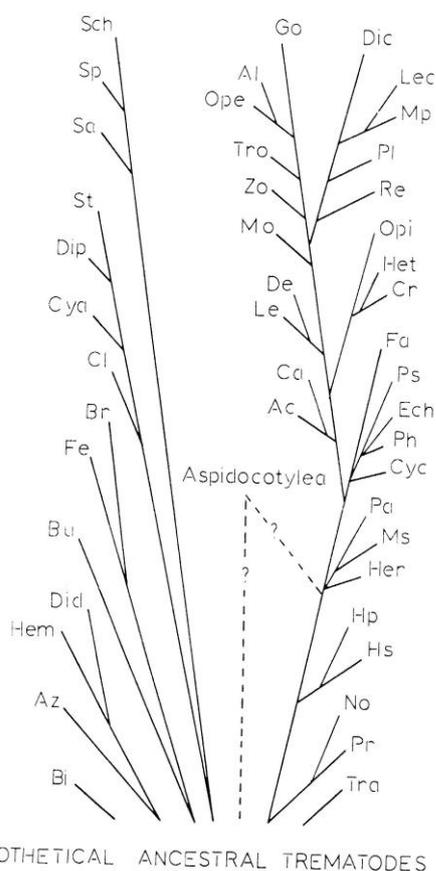


Рисунок 3. Схема филогенетических взаимоотношений трематод (по Cable, 1974).

Условные обозначения: Heronimidae Ward, 1917 [Her], Gyliauchenidae Ozaki, 1933 [Gyl], Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 [Pa], Microsaphidiidae Looss, 1900 [Ms], Pronocephalidae Looss, 1899 [Pr], Notocotylidae Liihe, 1909 [No], Cyclocoelidae Stossich, 1902 [Cyc], Psilostomidae Looss, 1900 [Ps], Fasciolidae Railliet, 1895 [Fa], Campulidae Odhner, 1926 [Ca], Philophthalmidae Looss, 1899 [Ph], Echinostomatidae Looss, 1899 [Ech], Rhopaliasidae Looss, 1899 [Rho], Haploporidae Looss, 1902 [Hp], Haplospalchnidae Poche, 1926 [Hs], Megaperidae Manter, 1934 [Me], Bivesiculidae Yamaguti, 1934 [Bi], Ptychogonimidae Dollfus, 1937 [Pt], Azygiidae Luhe, 1909 [Az], Hirudinellidae Dollfus, 1932 [Hi], Bathycotylidae Dollfus, 1932 [Ba], Hemiuridae Looss, 1899 [Hem], Accacoeliidae Odhner, 1911 [Acc], Syncoeliidae Looss, 1899 [Sy], Clinostomidae Liihe, 1901 [Cl], Sanguinicolidae Graff, 1907 [Sa], Spirorchiidae

Stunkard, 1921 [Sp], Schistosomatidae Stiles and Hassall, 1898 [Sch], Gymnophallidae Odhner, 1905 [Gym], Brachylaemidae Joyeux and Foley, 1930 [Br], Bucephalidae Poche, 1907 [Bu], Liolopidae Odhner, 1912 [Lio], Cyathocotylidae Mühling, 1898 [CY], Diplostomidae Poirier, 1886 [Dip], Strigeidae Railliet, 1919 [St], Opisthorchiidae Looss, 1899 [Opi], Cryptogonimidae Ward, 1917 [Cr], Heterophyidae Odhner, 1914 [Het], Deropristiidae Cable and Hunninen, 1942 [De], Homalometridae Cable and Hunninen, 1942 [Hal], Lepocreadiidae Odhner, 1905 [Le], Allocreadiidae Stossich, 1903 [All], Acanthocolpidae Liihe, 1906 [Ac], Troglotrematidae Braun, 1915 [Tro], Renicolidae Dollfus, 1939 [Re], Plagiorchiidae Ward, 1917 [PI], Cephalogonimidae Nicoll, 1915 [Ce], Prosthogonimidae Liihe, 1909 [Pros], Microphallidae Ward, 1901 [Mp], Gorgoderidae Looss, 1899 [Go], Opecoelidae Ozaki, 1925 [Ope], Zoogonidae Odhner, 1902 [Zo], Lissorchiidae Poche, 1926 [Lis], Dicrocoeliidae Looss, 1899 [Dic], Brachycoeliidae Looss, 1899 [Bc], Pleorchiidae Poche, 1926 [Ple], Pachypsolidae Yarnaguti, 1958 [Pach], Calycodidae Dollfus, 1929 [Call], Auridistornidae Stunkard, 1924 [Aur], Rhytidodidae Odhner, 1926 [Rhy]

Цитогенетический анализ кариотипов 95-ти видов трематод позволил выделить различные особенности хромосомных комплексов трематод: консерватизм и тенденцию уменьшения числа хромосом, образование огромных структурных единиц наследственного материала, сохранение раздельнополости и механизмов хромосомной детерминации пола лишь у филогенетически зрелой группы трематод, существование дополнительных *B*-хромосом у филогенетически молодых групп. Таким образом, данные расположенные в левой части схемы Кэйбла, включая тесные связи между семействами *Philophthalmidae* и *Ehinostomatidae*, а также *Cryptogonimidae*, *Heterophylidae* и *Opisthorchiidae* в правой части были подтверждены кариологическими данными учеными из Литвы в 1993 году (Баршене, 1993). Для завершения схемы, по мнению Баршене, требуются дополнительные данные.

К концу 80-х годов относится появление еще одной филогенетической гипотезы, принадлежащей Д. Бруксу. При описании своей гипотезы он воспользовался термином «церкомер» и предложил считать церкомером все прикрепительные органы, образованные как вырост паренхимы на заднем конце тела (Brooks et. al., 1985). Брукс обозначил гомологичными задний прикрепительный диск темноцефалид, удонеллид, моногеней, церкомер онкосферы и процеркоида, а также вентральную присоску (цит. по Корнаковой, 2009). Следует подчеркнуть, что кариологическая информация, полученная литовскими учеными, в определенной мере подтвердила правильность филогенетической схемы Брукса с соавторами (рис. 4). В серьезной ревизии

очевидно нуждается система отряда Plagiorchiiformes. Судя по особенностям хромосомного аппарата, в этот отряд были включены слишком разнородные группы трематод. Имеющуюся кариотипическую дистанцию нельзя оправдать ни ускоренными темпами эволюции, ни периодом процветания данной группы дигеней (Баршене, 1993).

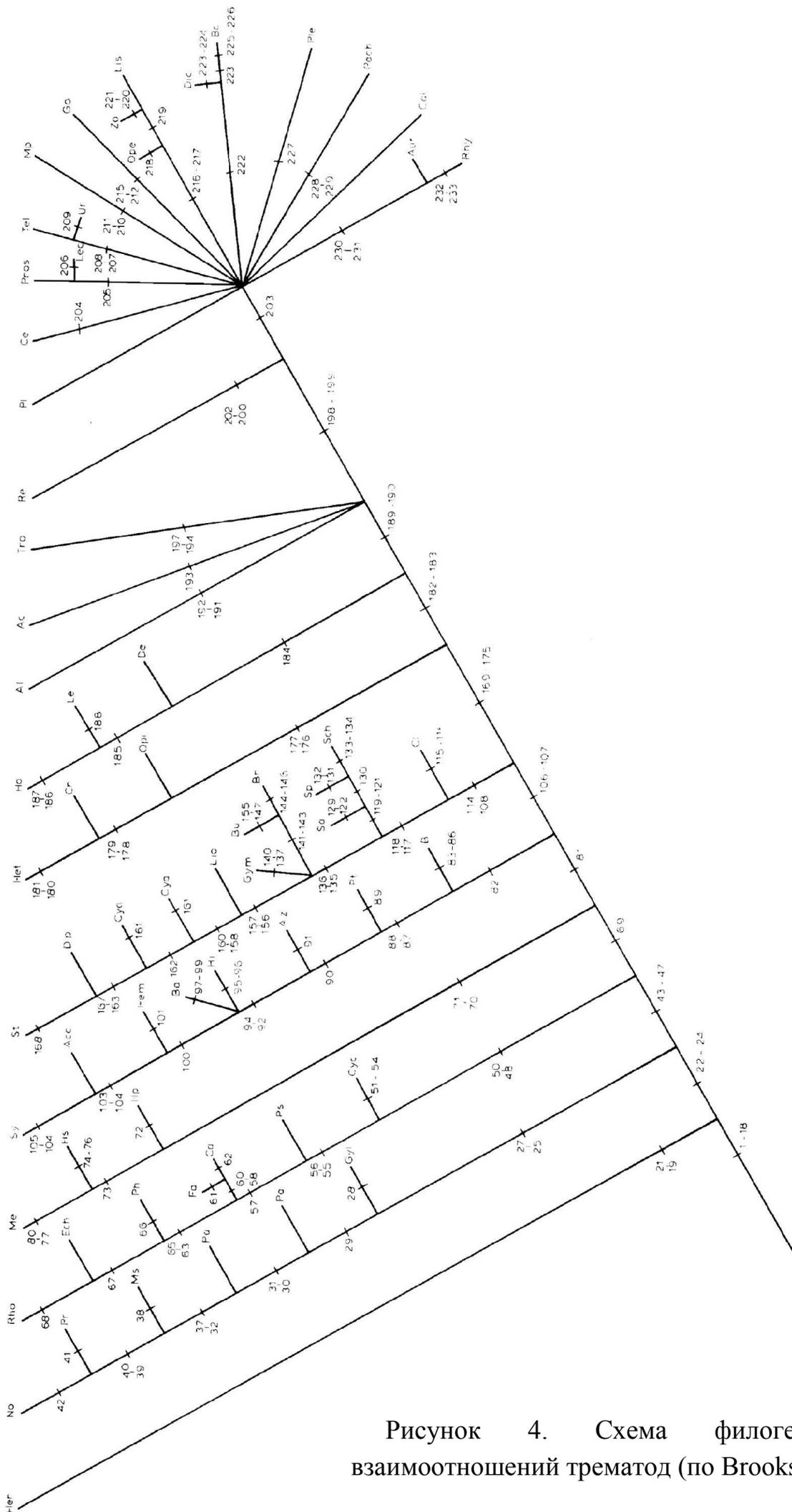


Рисунок 4. Схема филогенетических взаимоотношений трематод (по Brooks, 1985).

В 1993 году в Вильнюсе вышла монография Я. Баршене, освещающая систему филогенетических отношений трематод и имеющая под собой не только морфологическую, но и цитогенетическую основу. На основе цитогенетического анализа Баршене выделила четыре филетические группы трематод:

1. **Echinostomatoidea:** Paramphistomatidae, Notocotylidae, Cyclocoelidae, Fasciolidae, Philophthalmidae, Echinostomatidae, Echinochasmidae и Psilostomidae.
2. **Strigeoidea:** Strigeidae, Diplostomatidae, Cyathocotylidae, Brachylaemidae, Spirorchiidae, Schistosomatidae, Bucephalidae.
3. **Opisthorchoidea:** Opisthorchiidae, Cryptogonimidae, Heterophylidae.
4. **Plagiorchoidea:** Plagiorchiidae, Troglotrematidae, Rencolidae, Lecithodendridae, Telorchiidae и Prosthogonimidae.

Одним из основных критериев для выделения представленных групп послужило количество одноплечих хромосом в кариотипе трематод.

1. 3. 2. Филогенетические построения, основанные на использовании молекулярных маркеров

С середины 80-х годов двадцатого века для филогенетических построений в классических зоологических исследованиях начинают активно использовать молекулярно-генетические данные. В 1987 году Эйвис с соавторами вводит термин «филогеография» (phylogeography) и дается определение этому направлению, а также формулирует основные постулаты филогенетического анализа (Абрамсон, 2007).

Результативность и объективность филогенетических реконструкций, основанных на генных последовательностях организмов, зависит от множества факторов. Важнейшими причинами, которые могут приводить к несогласованности молекулярно-филогенетических гипотез и/или их низкой статистической поддержке, являются: недостаточный набор экспериментальных данных (длина последовательностей), выбор неадекватных для цели исследования

генов, ошибки при секвенировании и выравнивании последовательностей, выбор исследуемых таксонов, их неправильное определение, конвергентная или быстрая эволюция, гибридизация, горизонтальный перенос генов, внутри- и межгенная рекомбинация, смешение орто- и паралогичных генов в анализе, неполнота концертной эволюции, неодинаковая скорость накопления замен в разных таксонах и в разных позициях последовательностей, различия в нуклеотидном составе анализируемых последовательностей, нестационарность нуклеотидного состава, взаимозависимость эволюции отдельных сайтов в последовательностях, принятие неадекватной модели молекулярной эволюции и алгоритма построения деревьев (Банникова, 2004).

Значительное повышение объективности результатов молекулярно-генетического исследования организмов возможно благодаря правильному подбору маркерных участков. Обзор основных маркеров приведен в разделе 1. 2.

Заключительным этапом филогенетических исследований, как правило, является визуализация полученных связей путем построения филогенетических деревьев, с помощью различных моделей и методов.

Филогенетические модели и методы. Первым этапом филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей является их выравнивание с целью определения генетической, или эволюционной дистанции между ними. Основной для филогенетического анализа является информация о числе и качестве нуклеотидных замен. Поскольку в подавляющем большинстве случаев истинная эволюционная дистанция неизвестна, для ее оценки используются расчетные дистанции, основанные на различных представлениях о частоте различных нуклеотидных замен. Математически эти представления описываются в различных эволюционных моделях (Лукашов, 2009). Наиболее известные из них: модель Джукса-Кантора (Jukes and Cantor, 1969), модель Кимуры (Kimura, 1980), модель Тамуры-Неи (Tamura, Nei, 1993). Оптимальной модели для анализа любой группы последовательностей не существует, поэтому необходимо проводить оценку критериев выявления наиболее подходящего варианта для конкретного

исследования. Для этой цели существуют специальные компьютерные программы (Posada, Crandall, 1998).

Обязательный компонент любой филогенетической модели – это топология, то есть геометрическая, обычно двухмерная схема, показывающая генеалогические связи между единицами филогенетического анализа. Часто топология задается в виде ветвящегося дерева (Лухтанов, 2013). Филогенетические деревья можно реконструировать по последовательностям белков или нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). Любое дерево (филограмма, фенограмма) имеет такие части, как: узел, лист, ветвь, корень и кладу. Исключение составляют кладограммы, которые не снабжены длинами ветвей. Длины ветвей могут делиться по смыслу на два варианта. Во-первых, они могут трактоваться, как интервал времени между моментами существования двух последовательностей. Во-вторых, как число мутаций, случившихся на пути от одной последовательности до другой.

В зависимости от поставленной цели и определенной эволюционной модели, используются различные методы построения филогенетических деревьев. Каждый метод должен иметь теоретическое обоснование возможности его применения, а также включать набор алгоритмов, которые позволяют с учетом выбранной модели трансформировать изученное распределение признаков в филогенетическую реконструкцию (Лухтанов, 2013).

Представленные методы относятся к кладистическим, а значит, основаны на анализе дискретных признаков – апоморфий. Основное предположение кладистики заключается в том, что члены группы имеют общую эволюционную историю (Павлинов, 1998).

Во второй половине XX века был разработан метод максимального правдоподобия (ML – maximum likelihood estimation). Если имеется информация о закономерностях эволюционных преобразований признаков (иными словами, если разработана модель эволюции признака) и известно распределение состояний признаков у изучаемых организмов, то можно рассчитать вероятности

различных эволюционных траекторий, которые могли привести к современным формам, а затем выбрать наиболее вероятную из них (Лухтанов, 2013). Нередко используется также принцип Байеса (Bayesian inference). Этот подход в филогенетике занимается поиском деревьев с наибольшим уровнем правдоподобия (и в этом отношении похож на метод максимального правдоподобия), однако для расчета вероятностей использует Байесову статистику (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Метод максимальной экономии (MP – maximum parsimonious sites) направлен на поиск филогенетического дерева, требующего наименьшего числа эволюционных изменений (нуклеотидных замен) для объяснения наблюдаемых между анализируемыми последовательностями различий. В основе лежит анализ нуклеотидов, находящихся в так называемых филогенетически информативных позициях последовательностей. При построении дерева методом MP длины его ветвей будут пропорциональны минимально необходимому числу замен при переходе от одного узла к другому (Лукашов, 2009).

Кроме того, широко используются методы, которые относятся к фенетическим или дистанционным. В этом случае, деревья строятся на основе определенных генетических дистанций и не отражают эволюционного процесса, а только демонстрирует конечную степень дивергенции таксонов. Во второй половине 20 века Кимура предложил метод, который учитывает химические особенности мутационного процесса, а именно – неравную вероятность транзиций (Kimura, 1980). Сейчас этот метод, определяемый, как метод минимальной эволюции (ME – minimal evolution), предполагает, что общая длина всех ветвей на филогенетическом дереве должна быть минимальной. Такой фенетический алгоритм, как метод ближайшего соседа (NJ – neighbor-joining method) не использует перебор топологий и предварительные вычисления критериев. Поэтому в современных исследованиях такой алгоритм используется только в качестве предварительного этапа – перед построением, например, дерева методом ML.

Приведенные методы построения деревьев наиболее популярны при филогенетических исследованиях, но не являются единственными.

Большое значение в филогенетическом анализе уделяется и статистической оценке достоверности ветвления на получаемых кладограммах. Для статистической оценки используют универсальный статистический метод – бутстрэп-анализ (bootstrap analysis). При проведении бутстрэп-анализа программа создает 100 – 1000 случайных выборок последовательностей из анализируемой группы. Затем для каждой выборки строится филогенетическое дерево тем же методом и по той же модели, что и анализируемое. Все полученные кладограммы сравнивают с анализируемым деревом, определяя одинаковые внутренние узлы. Для каждого узла подсчитывают процент совпадения. Это число и является значением бутстрэп-анализа, определяя статистическую поддержку таксона. Уровень узловой поддержки является важным критерием оценки надежности каждой ветви дерева и, соответственно, дерева в целом. Как правило, достоверно установленными узлами считают те, для которых значение бутстрэп-анализа превышает 70, лучше – 90 (Лукашов, 2009).

Использование стандартных генетических маркеров, таких как рДНК, и доступность большого массива нуклеотидных последовательностей в международных базах данных, позволяют строить филогенетические деревья даже при минимальной выборке имеющихся образцов. Так, ученые из Таиланда, проводившие исследование мариит трематод, полученных из кишечника уток в местной провинции, описывают исследование 10 образцов: 4 трематоды, определенные, как *Echinostoma revolutum*, 4 – *Hypoderaeulm conoideurn* и 2 образца не определенные морфологически (Saijuntha, 2014). Для построения дерева авторы использовали двадцать четыре последовательности из базы данных GenBank. Анализ проводили с помощью метода NJ. В результате удалось подтвердить систематический статус и определить степень дивергенции изучаемых видов.

Чаще всего при изучении филогенетических отношений между таксонами высокого ранга (семейства и выше) в качестве маркера используют высококонсервативный участок рДНК, кодирующий участок 18S рРНК. Так, использование этого филогенетического маркера, позволило подтвердить родственные отношения между одноклеточными эукариотами – солнечниками и амебами (Николаев и др., 2003), а также установить степень родственности моногеной *Paradiclybothrium pacificum* и *Diclybothrium armatum* (Rozhkov, Shedko, 2015).

На настоящий момент в литературных источниках нет информации о филогенетических построениях внутри трематод рода *Leucochloridium*, основанных на данных молекулярно-генетического анализа. Получение подобной филогенетической схемы требует наличия нуклеотидных последовательностей ДНК и анализа их полиморфизмов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2. 1. Объекты исследования и сбор материала

Работа выполнена в Лаборатории экспериментальной зоологии (кафедра зоологии, РГПУ им. А. И. Герцена). В качестве *объектов исследований* были использованы партениты трематод рода *Leucochloridium* (Trematoda) следующих видов:

- *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835;
- *Leucochloridium perturbatum* Pojmanska, 1969 (syn. *L. actitis* Mcintosh, 1932);
- *Leucochloridium vogtianum* Baudon, 1881.

Спороцисты были отпрепарированы из моллюсков *Succinea putris*, собранных на территории Ленинградской области в районе г. Любань (59° 21' 00" N, 31° 15' 00" E) и пос. Вырица (59° 23' 48" N, 30° 19' 45" E) в период с 2008 по 2014.

2. 2. Оборудование и материалы

В работе было использовано следующее *оборудование*:

- микроскопы Leica DM1000, Leica DM5000, Zeiss EVO 40, Leica EM CPD300 (Германия);
- стереомикроскоп Leica M165C (Германия);
- сканирующий электронный микроскоп Zeiss EVO 40;
- гомогенизатор-диспергатор T10 basic ULTRA-TURRAX® — IKA (Германия);
- лабораторная центрифуга «Sigma3K30» (Германия);
- микроцентрифуги «Elmu» (Латвия);
- электронные весы «OHAUS» (Китай);
- вортекс «Elmu» (Латвия);
- спектрофотометр BioSpectrometer-kinetic Eppendorf (Германия);

- кюветы Eppendorf UVette (Германия);
- аппараты для горизонтального и вертикального гель-электрофорезов «Хеликон» (Москва);
- трансиллюминатор «Biosom» (Латвия);
- видеосистема геледокументирующая Gel Imager-2 «Хеликон» (Москва);
- термостат BS CH-100/CH-2, Biosan с возможностью охлаждения/нагревания для пробирок Eppendorf 20 × 1.5 (Латвия);
- термоциклер «Терцик-МС2», «ДНК-Технология» (Москва);
- холодильные камеры «Indesit», Швеция и «Sanyo» (Германия);
- ультра-низкотемпературный замораживатель Sanyo MDF-U3286S (Япония);
- генератор гранулированного льда BF 80 AS «Scotsman» (США);
- генетический анализатор (секвенатор) ABI PRISM 310 Applied Biosystems (США);
- вертикальный паровой стерилизатор DGM-300 (Швейцария);
- набор автоматических пипеток-дозаторов с переменным объемом от 0.1 до 1000 мкл «Ленпипет» (Россия); Bio-Rad Laboratories (США);
- лабораторный пластик (микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл и 0.5 мл, наконечники для автоматических пипеток, микропланшеты, штативы для пробирок, центрифужные пробирки для препаративного выделения препаратов ДНК и др.) разных производителей приобретены у фирмы «Медиген» (Новосибирск).

В работе были использованы следующие *химические реактивы, биопрепараты и расходные материалы*:

- реагенты для проведения электрофореза в полиакриламидном и агарозных гелях, сахароза, Тритон X-100, параформ (для приготовления раствора формальдегида), «Sigma» (США);
- неорганические соли – «Merck» (Германия);

- кислоты, щелочи, фенол, хлороформ – приобретены у фирмы «Вектон» (Санкт-Петербург);
- реагенты для проведения ПЦР (рекомбинантная Taq-ДНК-полимераза, буферные смеси, растворы солей, растворы dNTP, а также вода, свободная от РНК-аз, минеральное масло) – «ИнтерЛабСервис» (Москва);
- РНК-аза, свободная от ДНК-аз, а также протеиназа-К – «PromegaCorporation» (США);
- ДНК-маркеры (с шагом 100 п.н. и 1 т.п.н.), а также препарат ДНК фага λ – «Сибэнзим» (Новосибирск);
- праймеры для осуществления ПЦР синтезированы в фирме «Синтол» (Москва);
- набор для экстракции из геля фрагментов ДНК WizardSVGelandPCRClean – «UPSystem» (США);
- набор для очистки ДНК-амплификатов QIAquick PCR PurificationKit «Quagen» (Германия);
- набор для очистки смеси для сиквенс-реакции BigDye® XTerminator™ PurificationKit, «AppliedBiosystems» (США);
- реагенты для сиквенс-реакции BigDye® TerminatorKit v3.1, «AppliedBiosystems» (США);
- лабораторный пластик (микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 0,5 мл, наконечники для автоматических пипеток, микропланшеты, штативы для пробирок, центрифужные пробирки для препаративного выделения препаратов ДНК и др.) разных производителей приобретены у фирмы «Медиген» (Новосибирск).

2. 3. Сравнительно-морфологический анализ

Вскрытие моллюсков *Succinea putris* проводили под стереомикроскопом Leica M165C. Предварительное заключение о видовой принадлежности, обнаруженных при вскрытии паразитов, делали на основе окраски и формы отростков спороцисты. Перед вскрытием измеряли размер раковины моллюсков, а также размер и массу отпрепарированных спороцист. Для последующего проведения молекулярно-генетического анализа спороцисты помещали в эппендорфы и хранили при -70°C (ультра-низкотемпературный замораживатель Sanyo MDF-U3286S).

Для изучения на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) отобранный материал фиксировали и обезвоживали в восходящем градиенте концентраций этилового спирта, начиная с 20% раствора. Фиксированный материал помещали в специальные камеры. Все последующие операции по высушиванию объектов проводили в Leica EM CPD300. После напыления препараты изучали на микроскопе Zeiss EVO 40.

2. 4. Молекулярно-генетический анализ

Выделение хромосомной ДНК из спороцист трематод рода *Leucochloridium* проводили методом экстракции фенолом и хлороформом с последующей очисткой.

Отдельные отростки спороцист гомогенизировали в буфере А, содержащем 0.01 М Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 М ЭДТА; 0.25 М сахарозу и центрифугировали при $1600\times g$ 10 мин (центрифуга «Sigma3K30»). Полученный осадок ресуспензировали в буфере А, наслаивали на 1.5 М сахарозную подушку, содержащую 0.01 М Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 М ЭДТА и центрифугировали в течение 60 минут при $1600\times g$ и 4°C (центрифуга «Sigma3K30»). Осадок ядер ресуспензировали в буфере В, содержащем 0.01 М Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 М ЭДТА. К суспензии ядер добавляли панкреатическую РНК-азу до концентрации 20 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. К лизату добавляли протеиназу-К до конечной концентрации

100 мкг/мл, SDS до конечной концентрации 5% и инкубировали при 56°C 120 минут. Инкубационную смесь обрабатывали равным объемом свежеперегнанного насыщенного раствора фенола, рН 8.0, перемешивали в течение трех минут, путем плавного покачивания пробирок, центрифугировали при 1600×g, 4°C в течение 15 минут. К супернатанту добавляли смесь фенола и хлороформа в равном объеме, взятых в соотношении 1:1, и центрифугировали при 1600×g, 4°C 15 минут. Процедуру экстракции ДНК из полученного супернатанта повторяли равным объемом смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1. Высокополимерную ДНК осаждали двумя объемами охлажденного 96% этанола. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали до отсутствия запаха этанола, который определяли органолептически, и растворяли в минимальном количестве ТЕ-буфера, состоящего из 0.01 М Tris-HCl, рН 7.4 и 0.1 М ЭДТА.

Характеристика препаратов хромосомной ДНК. Концентрацию ДНК в препаратах измеряли спектрофотометрически при длинах волн УФ-спектра 260 и 280 нм согласно стандартной методике (Sambrook et al., 1991). О степени очистки ДНК от белков судили по соотношению значений оптических плотностей D260/D280.

Электрофоретический анализ препаратов хромосомной ДНК. Электрофорез ДНК проводили в 0.8% агарозном геле, приготовленном, на ТВЕ-буфере рН 8.0, содержащем 0.089 М Tris, 0.089 М борную кислоту и 0,002 М ЭДТА. ДНК в геле детектировали окрашиванием бромистым этидием (0.5 мкг/мл) по стандартной методике (Sambrook et al., 1991). Визуализацию зон ДНК проводили при УФ-освещении на горизонтальном поле трансиллюминатора. Для документирования гелей использовали видеосистему гель-документирования Gel Imager-2 (Хеликон, Россия).

Полимеразная цепная реакция со случайными праймерами (RAPD-анализ). Амплификацию ДНК осуществляли согласно методу, описанному Симпсоном (Simpson et al., 1993). Последовательности нуклеотидов в праймерах были взяты из литературы (Spada et al., 2002). Состав инкубационной пробы

(конечный объем 20 мкл) содержал: 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 200 мкМ каждого дНТФ, 2 мкл инкубационного буфера (1.5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8.5), 6.4 пМ праймера, от 1 до 4 нг ДНК. Реакционную смесь покрывали минеральным маслом до объема 25 мкл.

Температурный профиль ПЦР со случайными праймерами:

- | | | |
|---------|---------------------------------|-----------------------|
| 1. 95°C | 5 мин – иницирующая денатурация | |
| 2. 95°C | 30 сек – денатурация | } 2 цикла |
| 30°C | 2 мин – отжиг праймера | |
| 72°C | 1 мин – рост цепи | |
| 3. 95°C | 30 сек – денатурация | } 33 цикла |
| 40°C | 2 мин – отжиг праймеров | |
| 72°C | 1 мин – рост цепи | |
| 4. 95°C | 30 сек – денатурация | } заключительный цикл |
| 40°C | 2 мин – отжиг праймера | |
| 72°C | 5 мин – рост цепи | |

Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов в полиакриламидном геле. Анализ ПЦР-продуктов, получаемых с помощью случайных праймеров, проводили в 8% ПААГ, приготовленном на TBE-буфере (см. выше) в аппарате для вертикального гельэлектрофореза. Гель содержал 30% акриламид, 1/10 часть от объема 10×TBE-буфера; 0.25% TEMED и 0.075% ПСА. Визуализацию электрофоретических профилей ДНК-амплификатов осуществляли с помощью окрашивания азотнокислым серебром. После прохождения электрофореза гель инкубировали в 10% уксусной кислоте в течение 20 минут, а затем отмывали в воде 2 раза по 2 минуты. Затем гель инкубировали 30 минут в 0.1% AgNO₃ и помещали в проявляющий раствор, содержащий 3% Na₂CO₃, 0,11% параформальдегид и 0.0004% тиосульфат натрия, до проявления окрашенных зон ДНК и фиксировали в 10% уксусной кислоте. Для документирования гели помещали между прозрачными листами пластика и сканировали.

Полимеразная цепная реакция со специфическими для рДНК праймерами. Состав реакционной смеси для проведения ПЦР (конечный объем 20 мкл) содержал: 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 200 мкМ каждого дНТФ, 2 мкл инкубационного буфера (1.5 мМ MgCl₂, 50мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8.5), 6.4 пМ праймера (табл. 2.1), 2нг ДНК. Реакционную смесь покрывали минеральным маслом до объема 25 мкл.

Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 1,4% агарозном геле (согласно описанной выше методике).

Очистка ПЦР-амплификатов рДНК. Очистку ПЦР-продуктов проводили при помощи набора QIAquick PCR PurificationKit (Qiagen, Германия) по прилагающейся к набору инструкции фирмы изготовителя. Итоговую концентрация ДНК в растворе определяли при помощи спектрофотометра EppendorfBioPhotometer (Германия), в кюветах EppendorfUVette (Германия) с длиной оптического пути 10 мм.

Таблица 2.1. Специфические праймеры, используемые для анализа рДНК трематод рода *Leucochloridium*.

№	Обозначение праймера	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Расчетный размер продукта	Температура отжига праймеров (T _{ан})
1	F1	Fw: ATGCTCTGATGGTATGCTCGTAG	933 п. н.	62°C
	R1	Rev: TTCCTCCGCTTAGTGATATGC		
2	F2	Fw: TCCTGGTAAGTGCAAGTCATAAG	889 п. н.	66°C
	R2	Rev: CTGCACTCTTCATCGACACAC		
3	F4	Fw: TGATGGTAGTGTGTGTCTCGC	621 п. н.	63°C
	R4	Rev: CGTTACCCGTTATCACCATG		
4	F3	Fw: ТАСТААСАТАТГАГГТГССАГАТС	479 п. н.	66°C
	R3	Rev: ТАТСАТТГСТГГАСТТАГГГ		
5	F6	Fw: GTACCACCAAGCGTTTGAGC	416 п. н.	61°C
	R6	Rev: CGGCCTAGCCGAACACATAA		

№	Обозначение праймера	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Расчетный размер продукта	Температура отжига праймеров (T _{an})
6	F5	Fw: CGGGTTGTTTGTGAATGCAG	601 п. н.	60°C
	R5	Rev: CTTAGCCATCAGCAGACCCAC		
7	F7	Fw: ACAGTCGTGTAAGCGGGATG	412 п. н.	61°C
	R7	Rev: GTCAGGGCATAGTGGCATGTA		
8	F8	Fw: ATTATGCTCAGGTCGTGGCTC	495 п. н.	62°C
	R8	Rev: TCAACTCCACCCGTTTACCT		

Секвенирование исследуемых фрагментов рДНК. Секвенирование ПЦР-амплификатов осуществляли в фирме «Синтол» (Москва) или проводили самостоятельно при помощи набора фирменных реагентов BigDye® TerminatorKit v3.1 по прилагающемуся протоколу фирмы производителя. В реакции использовали 10 нг очищенного ПЦР-продукта. В качестве контроля качества проведения реакции использовали входящую в набор Д-плазмиду рGEM® с праймером M13. Очистку полученной смеси от низкомолекулярных компонентов проводили при помощи набора реагентов BigDye® XTerminator™ PurificationKit («AppliedBiosystems», США) по прилагающемуся протоколу фирмы производителя. Продукты сиквенс-реакции анализировали при помощи 4-капиллярного ДНК-анализатора АВ 3130, («AppliedBiosystems», США). Для электрофоретического разделения использовали массив капилляров с длиной пробега 50 см и заполняющий полимер ПДМА-6 («Синтол», Москва). В работе использовали модифицированный инструментальный протокол, созданный на основе стандартного. По сравнению с протоколом «Standard sequencing» общее время прогона было увеличено до 3400 секунд для анализа фрагментов максимального размера.

2. 5. Методы работы с нуклеотидными последовательностями

Источником информации об известных нуклеотидных последовательностях трематод служила открытая база данных «GenBank» (Benson et al., 2008) на сервере NCBI (National Center for Biotechnology Information – Национальный центр биотехнологической информации США), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Для поиска нуклеотидных последовательностей и анализа их гомологии использовали программу «BLAST», <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Mc Ginnis, Madden, 2004).

Дизайн праймеров и подбор условий амплификации осуществляли в программах «Gene Runner 3.0» и «Primer 3», <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Сборку и выравнивание электрофореграмм осуществляли при помощи программного обеспечения BioEdit, <http://www.mbio.ncsu.edu> (Hall, 1999).

Построение вторичных структур ДНК проводили с помощью онлайн сервиса на сервере mfold, <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>.

Выбор оптимальной математической модели для расчета генетических дистанций осуществляли с помощью программы Modeltest v. 3.06 (Posada, Crandall, 1998).

Для *расчета генетических дистанций* использовали пакет программ Mega v. 3.0 (Kumar et al., 2004).

Филогенетические реконструкции выполняли методами ближайшего соседа NJ (Neighbor-joining), максимальной экономии MP (Maximum parsimony) и максимального правдоподобия ML (Maximum likelihood). Для оценки достоверности каждого ветвления в филогенетических реконструкциях использовали бутстрэп-анализ (bootstrap analysis) (Felsenstein, 1985) при количестве репликаций 1000.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3. 1. Общая характеристика спороцист трематод *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*

Моллюски *Succinea putris* (312 особей), зараженные трематодами рода *Leucochloridium*, собраны в районе поселка Вырица и города Любань Ленинградской области в 2008–2014 гг. В процессе сбора моллюски и извлеченные из них спороцисты были взвешены, измерены, каталогизированы и помещены в морозильную камеру на -80°C . Всего на молекулярно-генетические исследования было отобрано 42 спороцисты.

На основании морфологических признаков (форма и окраска отростков) все спороцисты были отнесены к трем видам. Из 312 зараженных сукциней 267 (85.6%) особей были заражены *L. paradoxum*; 35 (11.2%) особей *L. perturbatum*; 1 (0.3%) особь *L. vogtianum*. При этом последний вид был обнаружен только один раз – в составе тройной инвазии (см. раздел 3. 1. 3). Кроме этого было описано 9 (2.9%) двойных инвазий, представленных трематодами *L. paradoxum* и *L. perturbatum*.

Визуальные исследования показали, что спороцисты всех изученных видов *Leucochloridium* организованы сходно и соответствуют описаниям в литературе (см.: Rojmanska, Mahaj, 1991; Атаев и др., 2013; Атаев, Токмакова, 2015).

Тело спороцисты состоит из (А) центральной части столона, которая локализуется в гепатопанкреасе моллюска-хозяина; (Б) трубчатых участков, отходящих от центральной части к мешковидным отростками спороцисты (В), приобретающими в процессе созревания видоспецифичную форму и окраску (рис. 5, 6). В зрелых отростках насчитывается от 50 до 300 метацеркарий, формирующихся в центральной части столона и проникающих сюда по трубчатым участкам.

3. 1. 1. Спороцисты трематод *Leucochloridium paradoxum*

Спороцисты *L. paradoxum* составили подавляющее большинство случаев трематодных заражений сукциней (см. выше).



Рисунок 5. Моллюск *Succinea putris* зараженный *Leucochloridium paradoxum*.

Спороцисты этого вида формируют 2 – 3 зрелых отростка, размеры которых составляли $10.4 \pm 2.6 \times 2.3 \pm 0.5$ мм (минимум – 4.0×1.2 мм, максимум – 18.0×2.6 мм) (рис. 6). При этом средний вес отростков составил 0.03 ± 0.01 г (от 0.005 г до 0.07 г).

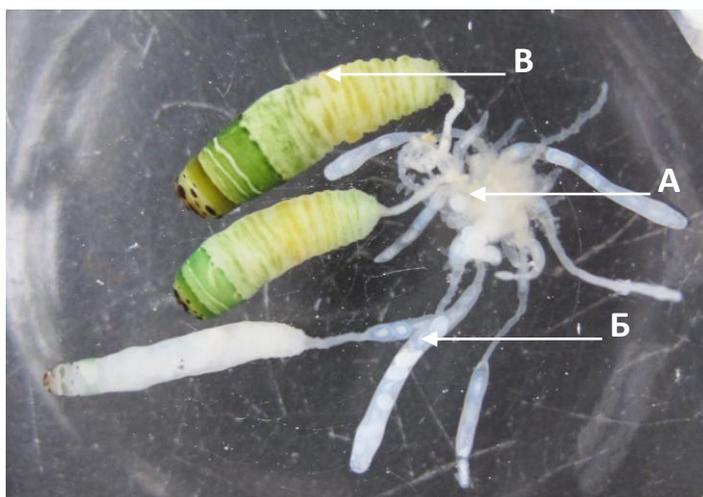


Рисунок 6. Отпрепарированная спороциста *Leucochloridium paradoxum*.

Условные обозначения: А – центральная часть столона; Б – трубчатые участки спороцисты; В – мешковидные отростки спороцисты.

На основании распределения пигментов в покровах спорцист *L. paradoxum* было выделено семь вариантов их окраски (рис. 7), однако все они могут быть сведены к одному обобщенному типу.

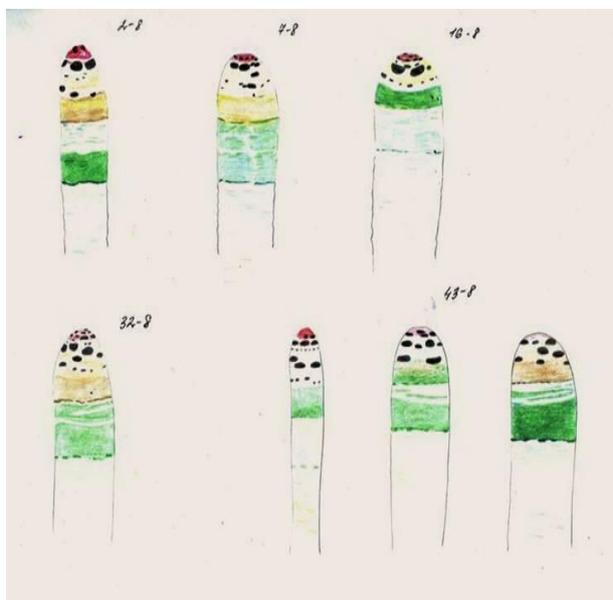


Рисунок 7. Варианты окраски отростков спорцист *Leucochloridium paradoxum* (рисунок А. С. Токмаковой).

Вершина зрелого отростка окрашена в красно-коричневый цвет и окружена несколькими темно-коричневыми бугорками («бородавками»). Ниже идет светлое кольцо, а за ним следует узкое кольцо коричневого цвета. Далее хаотично расположены коричневые пятна разного диаметра. Еще ниже эти пятна выстраиваются в форме кольца. Затем следуют две широкие зеленые полосы, разделенные желтым кольцом. На оставшейся части (две трети длины отростка) расположены узкие кольца, обычно незамкнутые. Их цвет может варьировать от ярко зеленого до желтого.

Рисунок формируется в процессе развития отростков спорцист. На определенном этапе у них хорошо заметны элементы окраски красного цвета, которые исчезают у зрелых отростков.

Длина отростка на момент появления первых признаков окраски составляет $7.9 \pm 1.5 \times 1.6 \pm 0.5$ мм.

Важно отметить способность отростков спороцист *L. paradoxum* к пульсации, усиливающейся на свету. Благодаря интенсивным сокращениям они могут проникать в щупальца моллюска. При этом они становятся хорошо заметны. В случае раздражения отростков они быстро уходят вглубь тела улитки за счет сокращения мышц трубчатых участков столона спороцисты.

Структуру покровов спороцисты рассматривали с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис.8). На поверхности заметны характерные концентрические складки, благодаря которым осуществляется растяжение и сокращение покровов. Ранее подобные складки были описаны и для спороцист других видов (Shulong et. al., 1985; Coustau et al., 1997).



Рисунок 8. Апикальная часть зрелого отростка спороцисты трематоды рода *Leucochloridium*.

На переднем участке отростка хорошо видны бугорки разного размера. Именно они заметны у живых спороцист благодаря темно-коричневой окраске. Их функциональное значение остается неясным. Возможно, они также образуют рисунок отростка, привлекающий потенциальных дефинитивных хозяев. Однако мы допускаем, что совокупность данных бугорков образует на дистальном конце

отростка структуру, облегчающую прободение эпителия моллюска при самостоятельном выходе отростков во внешнюю среду (стр. 15).

3. 1. 2. Трематоды *Leucochloridium perturbatum*

Моллюски, зараженные трематодами *L. perturbatum*, на обеих обследованных территориях Ленинградской области встречали в сборах реже, чем *L. paradoxum* (рис. 9).

Спороцисты *L. perturbatum* имели по 2 – 3 зрелых отростка (рис. 9, 10). Размеры последних составили $8.8 \pm 2.2 \times 2.2 \pm 0.5$ мм (минимум – 5.6×1.5 мм, максимум – 13.5×3.0 мм). При этом средний вес отростков составил $0,05 \pm 0,01$ г (от 0.02 г, до 0.16 г).



Рисунок 9. Моллюск *Succinea putris* зараженный *Leucochloridium perturbatum*.

Насыщенность цвета зрелых отростков прямо пропорциональна степени их зрелости, что хорошо заметно на отпрепарированной спороцисте (рис. 10).

При рассмотрении окраски спороцист *L. perturbatum* можно выделить некоторые закономерности. Визуально отросток можно разделить на две части: верхнюю, более пигментированную, и нижнюю, которая окрашена слабее.

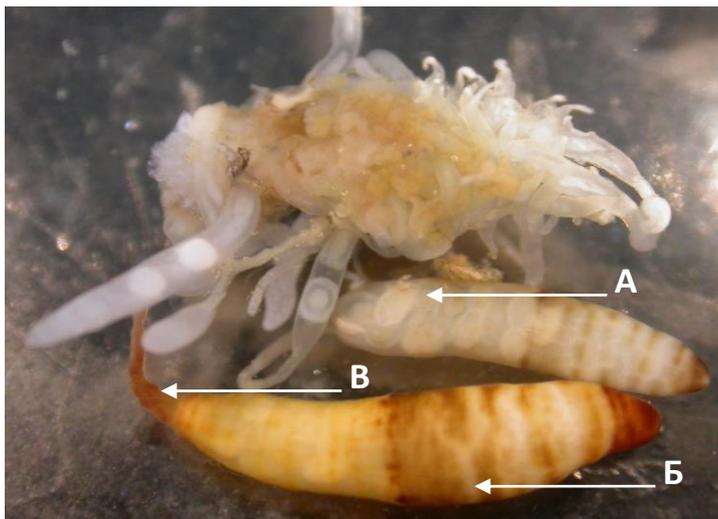


Рисунок 10. Отпрепарированная спороциста *Leucochloridium perturbatum*.

Условные обозначения: А – незрелый отросток спороцисты; Б – зрелый отросток спороцисты; В – каудальная часть отростка.

Рисунок окраски отростка представляет собой чередование светлых и темных полос. При этом их цвет варьирует от светло-желтого до коричневого. Вершина зрелых отростков окрашена близкорасположенными полосами коричневого цвета. Часто эти полосы выступают над поверхностью покровов, образуя рельефные кольца. В отличие от *L. paradoxum* у спороцист *L. perturbatum* на вершине отростка отсутствуют «бородавки», однако они хорошо заметны на каудальной части, в области перехода отростка в трубчатую часть (рис. 10).

Менее окрашенную заднюю часть отростка, как правило, отделяет темная полоса, состоящая из близко расположенных коричневых пятен.

По характеру двигательной активности отростки спороцист *L. perturbatum* очень напоминают ранее описанные отростки *L. paradoxum*.

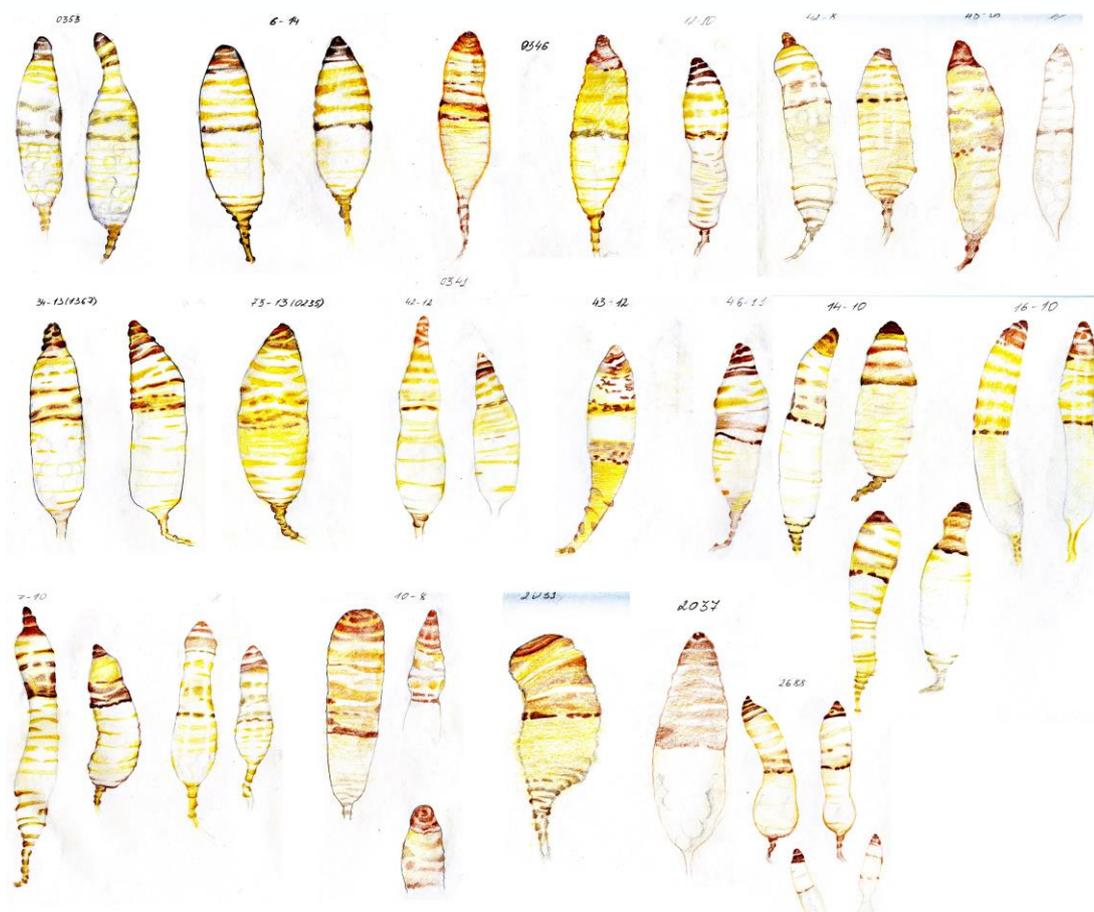


Рисунок 11. Варианты окраски отростков спороцист *Leucochloridium perturbationis* (рисунок Р. Р. Усмановой).

3. 1. 3. Трематоды *Leucochloridium vogtianum*

Спороцисты *Leucochloridium vogtianum* обладают оригинальным строением отростков. Их покровы равномерно окрашены в оттенки желтого и только на вершине расположены коричневые пятна. При этом большая часть отростка покрыта хорошо заметными папиллообразными выростами. Так как малоподвижные отростки спороцист этого вида не проникают в щупальца улиток, как это происходит с другими представителями рода *Leucochloridium*, обнаружить партенит *L. vogtianum* обычно удается только при вскрытии моллюска. В наших сборах был зафиксирован единственный случай заражения моллюска *L. vogtianum*. В литературе не упоминается факт обнаружения на территории

Ленинградской области (ЛО) спороцисты трематоды этого вида. Моллюск был найден в окрестностях города Любань, ЛО.

Данная спороциста была обнаружена в составе множественной инвазии моллюска тремя видами трематод *L. perturbatum*, *L. vogtianum* и *L. paradoxum* (рис. 12).

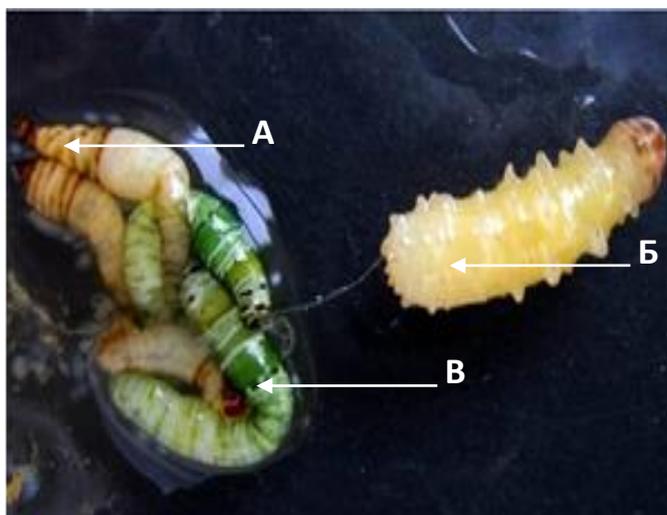


Рисунок 12. Спороцисты трематод рода *Leucochloridium*, отпрепарированные из одного моллюска.

Условные обозначения: А – *Leucochloridium perturbatum*; Б – *Leucochloridium vogtianum*; В – *Leucochloridium paradoxum*.

Явление множественного заражения интересно механизмом, препятствующим гиперинвазии моллюска-хозяина. Однако описание таких инвазий в литературе – довольно редко встречающееся событие.

Описанные морфологические признаки спороцист позволили отнести исследуемые особи трематод к описанным в литературе видам *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*. Однако, для уточнения таксономического статуса трематод рода *Leucochloridium*, а также для оценки уровня внутривидовой и межвидовой изменчивости в настоящее время необходимы данные молекулярно-генетических исследований. Результаты генотипирования ядерной ДНК особей

треб видов: *L. paradoxum* Carus, 1835, *L. perturbatum* Pojmanska, 1965 и *L. vogtianum* Baudon, 1881 будут изложены в следующем разделе.

3. 2. Создание банка ядерной ДНК трематод р. *Leucochloridium*

Из каталогизированного банка отдельных спороцист трематод рода *Leucochloridium*, извлеченных из моллюсков *Succinea putris* коллекции 2008 – 2014 гг. были взяты 42 особи для выделения хромосомной ДНК.

Хромосомную ДНК из отростков спороцист трематод выделяли методом экстракции фенолом-хлороформом из ядер, очищенных при центрифугировании через сахарозную «подушку», что исключает вероятность присутствия в исследуемых препаратах митохондриальной ДНК.

3. 2. 1. Характеристика исследуемых образцов ДНК

Всего было выделено 42 образца хромосомной ДНК трематод рода *Leucochloridium*: 13 – из особей с коричневой окраской отростка, 28 – из спороцист с зеленой окраской и из 1 спороцисты с пузырьчатыми покровами. По данным электрофоретического анализа все препараты ДНК были высокополимерные и не деградированы (рис. 13).

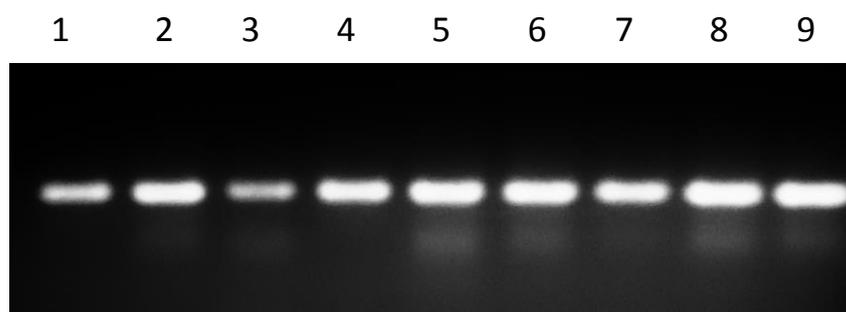


Рисунок 13. Электрофореграмма образцов хромосомной ДНК трематод рода *Leucochloridium*.

Примечания: 0,8% агароза. Образцы взяты из созданного банка случайно – для демонстрации нативности используемых препаратов. На дорожки наносили разное количество ДНК. 1, 2, 3 – ДНК особей с зеленой окраской отростков; 4, 5, 6 – ДНК особей с коричневой окраской отростков; 7, 8, 9 – ДНК спороцисты с пузырьчатыми покровами.

Концентрацию ДНК и степень очистки от белков в первичных препаратах определяли спектрофотометрически.

*Из охарактеризованных препаратов был создан банк хромосомной ДНК 42 особей трематод рода *Leucochloridium*, по морфологическим признакам идентифицированных как: *L. paradoxum* Carus, 1835, *L. perturbatum* Pojmanska, 1965 и *L. vogtianum* Baudon, 1881.*

3. 3. Анализ ДНК трематод р. *Leucochloridium* с помощью случайных праймеров (RAPD-анализ)

Для генотипирования малоизученных видов, к которым относятся трематоды рода *Leucochloridium*, широко применяют неспецифические методы, не требующие исходной информации о последовательностях ДНК. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – наиболее простой из этих методов, хотя недостатком этого метода для картирования является чувствительность к экспериментальным условиям и требование стандартизации реактивов и экспериментальных протокольных компонентов (Grosberg et al., 1996). В настоящее время RAPD-технология широко используется в изучении генома (конструирование генетических карт, анализ генетической структуры популяций, генотипирование, маркирование признаков) (Vidigal et al., 1994; Lewis et al., 1997; Sire et al., 2000; Carvalho et al., 2001; Spada et al., 2002; Oliveira et al., 2008). Для получения набора ампликонов используют, как правило, один короткий праймер длиной 10 нуклеотидов. В результате получается один-два десятка полос на геле, которые затем рассматриваются как независимые признаки данного образца.

Для генотипирования трематод *Leucochloridium* sp. методом RAPD-анализа была использована созданная в нашей лаборатории на основе анализа литературы коллекция случайных праймеров, с помощью которых ранее был осуществлен поиск внутривидового полиморфизма между роговыми катушками, зараженными

и незараженными партенитами трематод (Рыжик, 2009), а также улитками из разных географических популяций (Прохорова и др., 2014).

В работе были использованы 10-нуклеотидные праймеры. Всего в работе на исследуемых ДНК были опробованы 10 праймеров с разными вариантами чередования нуклеотидов в цепочке (табл. 3.1). Однако, воспроизводимые результаты, демонстрирующие четкое различие между электрофоретическими профилями RAPD-амплификатов ДНК зеленых, коричневых спороцист и спороцисты с пузырьчатыми покровами, были получены только с праймером G8.

Таблица 3.1. Случайные праймеры, используемые для анализа ДНК трематод рода *Leucochloridium*.

Обозначение праймера	Последовательность нуклеотидов	Источник
G1	5' TGCCGAGCTG 3'	Abdel-Hamid et al., 1999
G2	5' GTTGCCAGCC 3'	Abdel-Hamid et al., 1999
G3	5' AGGGAACGAG 3'	Abdel-Hamid et al., 1999
G4	5' GGTCCCTGAC 3'	Spada et al., 2002
G5	5' CAGGCCCTTC 3'	Spada et al., 2002
G6	5' CTCTCCGCCA 3'	Spada et al., 2002
G7	5' AGTGCTACGT 3'	Spada et al., 2002
G8	5' CTGATGCTAC 3'	Spada et al., 2002
G9	5' GGGTAACGCC 3'	Spada et al., 2002
G10	5' CTGCTGGGAC 3'	Abdel-Hamid et al., 1999

Анализ электрофореграмм показал, что профили RAPD-амплификатов, полученных с праймером G8, на генетическом материале спороцист одного цвета, полностью совпадают, в то время как набор ПЦР-продуктов, их размеры и соотношение в профиле, полученные на ДНК спороцист разной окраски и морфологии, отличаются.

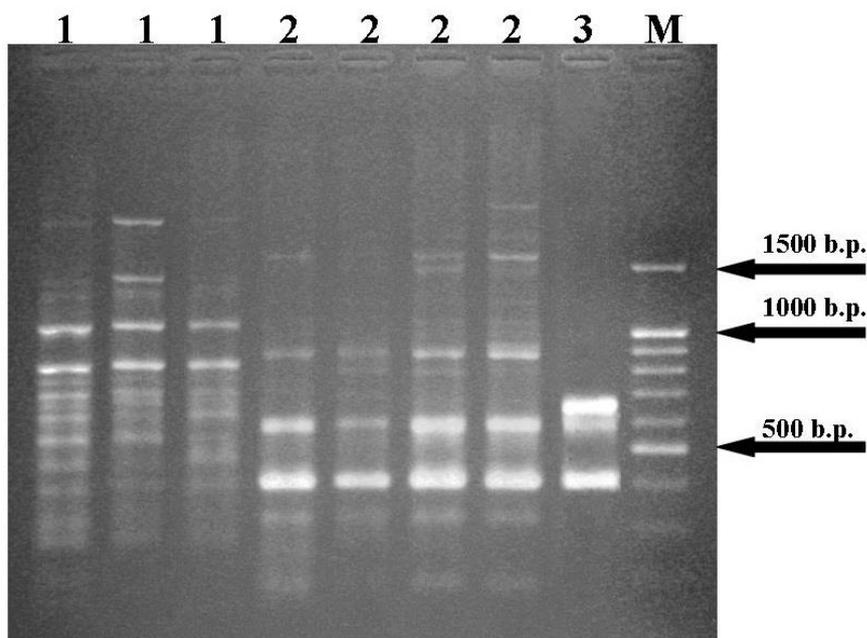


Рисунок 14. Сравнение электрофоретических профилей ПЦР-продуктов ДНК трематод рода *Leucochloridium*, полученных с помощью праймера G8.

Примечания: 1,4% агароза. 1 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК коричневых спороцист; 2 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК зеленых спороцист; 3 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК спороцисты с пузырьчатыми покровами; М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.

Сравнение профилей фрагментов ДНК проводили в диапазоне длин 300–1500 п.н. (рис. 14). Для всех исследуемых образцов ДНК были определены приблизительные размеры полученных с помощью праймера G8 ПЦР-продуктов (относительно размеров фрагментов ДНК-маркера), а также был рассчитан коэффициент подобия по Дайсу (табл. 3.2–3.4). Коэффициент подобия по Дайсу рассчитывали по формуле (Vidigal et al., 1994):

$$S = \frac{2a}{2(a + b + c)}$$

где S – коэффициент подобия по Дайсу;

a – количество фрагментов, полученных на ДНК трематодт рода *Leucochloridium* со спороцистами обоих видов;

b – количество фрагментов, полученных на ДНК со спороцистами первого вида;

c – количество фрагментов, полученных на ДНК со спороцистами второго вида.

Таблица 3.2. Результаты RAPD–анализа с праймером G8 ДНК трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium perturbatum*.

ПЦР-продукты ДНК п.н. / кол-во		Кол-во одинако- вых фрагмен- тов (a)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>paradoxum</i> (b)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>perturbatum</i> (c)	Кэф- фициент подобия по Дайсу (S)
<i>Leucochloridium paradoxum</i>	<i>Leucochloridium perturbatum</i>				
1590	1645	1	6	7	0.36
1355	1475				
910	1410				
800	1665				
585	825				
400	700				
335	400				
	290				
7	8				

Таблица 3.3. Результаты RAPD–анализа с праймером G8 ДНК трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium vogtianum*.

ПЦР-продукты ДНК п.н. / кол-во		Кол-во одинако- вых фрагмен- тов (a)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>paradoxum</i> (b)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>vogtianum</i> (c)	Кэф- фициент подобия по Дайсу (S)
<i>Leucochloridium paradoxum</i>	<i>Leucochloridium vogtianum</i>				
1590	660	1	6	2	0.06
1355	585				
910	400				
800					
585					
400					
335					
7	3				

Таблица 3.4. Результаты RAPD–анализа ДНК с праймером G8 трематод *Leucochloridium perturbatum* и *Leucochloridium vogtianum*.

ПЦР-продукты ДНК п.н. / кол-во		Кол-во одинако- вых фрагмен- тов (а)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>perturbatum</i> (b)	Кол-во фрагментов, полученных только на ДНК <i>L.</i> <i>vogtianum</i> (с)	Кэф- фициент подобия по Дайсу (S)
<i>Leucochloridium perturbatum</i>	<i>Leucochloridium vogtianum</i>				
1645 1475 1410 1665 825 700 400 290	660 585 400	1	7	2	0.05
8	3				

Данные, представленные на рисунке 14 и в таблице 3.2, показывают, что особи трематод, имеющие одинаковую окраску спороцист, как зеленую, так и коричневую, характеризуются выраженным идентичным электрофоретическим профилем ПЦР-амплификатов ДНК. Таким образом, основанное на морфологическом признаке (цвет окраски спороцисты) таксономическое видоопределение трематод рода *Leucochloridium*, подтверждается молекулярно-генетическим анализом: вид с зелеными полосками на спороцистах – *L. paradoxum*, с коричневыми – *L. perturbatum* (Pojmanska, 1962, 1967; Lewis et al., 1977; Bakke, 1980, 1982; Ataev et al., 2013 a, b). Электрофоретический профиль, полученный на ДНК трематоды третьего вида, визуально отличается от профилей *L. paradoxum* и *L. perturbatum* (рис. 14, табл. 3.3, 3.4). Это позволяет говорить о том, что определение данного вида, как *L. vogtianum* на основании морфологических признаков также подтверждается молекулярно-генетическими данными.

Результаты генотипирования ДНК трематод рода Leucochloridium, полученные с помощью RAPD-анализа, т.е. экспресс методом выявления генетического полиморфизма, являются основанием для исследования

конкретных участков ДНК с целью подтвердить не только идентичность видовой принадлежности особей представителей рода *Leucochloridium* из различных популяций, но и выявить конкретные индивидуальные молекулярно-генетические полиморфизмы каждого из изучаемых видов.

3. 4. Анализ ДНК трематод р. *Leucochloridium* с помощью специфических праймеров

Использование специфических праймеров позволяет выявить и проанализировать индивидуальные полиморфные признаки организмов на уровне нуклеотидных последовательностей маркерных участков ДНК. Такие глубокие молекулярно-генетические исследования дают основание для выводов о филогенетическом положении тех или иных видов трематод. Как было отмечено в обзоре литературы, одним из наиболее часто используемых молекулярных маркеров эукариот являются нуклеотидные последовательности рибосомного кластера ДНК (рДНК).

3. 4. 1. Дизайн специфических праймеров

Для выявления межвидовых генетических полиморфизмов трематод рода *Leucochloridium* исследовали участок ядерной ДНК, представленный тандемно расположенными кластерами генов рибосомных РНК (рДНК).

В 2009 году, когда мы приступили к данному исследованию, в генетических базах данных, в частности в базах GenBank, были аннотированы только несколько нуклеотидных последовательностей рДНК трематод рода *Leucochloridium*. Это исследования двух групп ученых из лабораторий Великобритании и Польши, которые опубликовали сведения о частичном секвенировании участка рДНК трематод рода *Leucochloridium*: фрагмент ITS1, весь участок рДНК, кодирующий 5.8S рРНК и ITS2, а также часть участка гена 28S рРНК *Leucochloridium* sp. (Casey et al., 2003), часть последовательностей гена 18S рРНК и часть гена 28S рРНК *Leucochloridium perturbatum* (Olson et al., 2003). Результаты частичного

секвенировании гена 28S рРНК *Leucochloridium perturbatum* приводятся в работе исследователей из Киева, Украина (Tkach et al., 2001).

Данные по этим секвенированным последовательностям представлены в таблице 3.5. В 2011 году, в базе данных GenBank группой ученых из Польши (I. Rząd, P. Hofsoe, R. Panicz, J. K. Nowakowski) были заявлены еще три последовательности рДНК: JF346883.1 и JF274482.1 для *L. paradoxum* и JF331664 для *L. perturbatum*, которые приведены в статье, опубликованной этими исследователями только в 2014 году (Rząd et al., 2014). Представленные в таблице данные включают неполную последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1, полную последовательность 5.8S рРНК и полноразмерную последовательность второго внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2, полученные для рДНК трематод с зелеными и коричневыми окрасками отростков спороцист соответственно (Casey et al., 2003), частично секвенированный участок рДНК, кодирующий структуру 18S рРНК *L. perturbatum* (Olson et al., 2003) и 28S рРНК *L. perturbatum* (Tkach, 2001; Casey et al., 2003; Olson et al., 2003), а также *L. paradoxum* (Casey et al., 2003).

Дизайн специфических праймеров на участок рДНК осуществляли с помощью ресурсов базы данных GenBank, а в последующем и собственных данных, получаемых в ходе секвенирования исследуемого участка ДНК трематод (табл. 2.1 и табл. 3.5). В результате были подобраны специфические праймеры на протяженный участок, кодирующий рРНК: 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига и расчетные размеры ДНК-амплификатов, получаемых в направляемых ими ПЦР, приведены в разделе Материалы и методы (табл. 2.1).

Таблица 3.5. Нуклеотидные последовательности трематод рода *Leucochloridium*, представленные в GenBank.

№	Индекс в GenBank	Число нуклеотидов в цепи	Участок кластера рДНК	Объект	Дата аннотирования последовательности	Авторы
1	JF331664	1021	ITS 1 p.s.*; 5.8S рРНК и ITS2 c.s.**; 28S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium perturbatum</i>	21. 03. 2011	Rzad,I., Hofsoe,P., Panicz,R. and Nowakowski, J.K. Unpublished
2	AY258145	1197	ITS 1 p.s.; 5.8S рРНК и ITS2 c.s.; 28S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium</i> sp. (зеленый)	23. 01. 2004	Casey, S.P., Bakke, T.A., Harris, P.D. and Cable, J. (Casey at all, 2003)
3	AY258144	1239	ITS 1 p.s.; 5.8S рРНК и ITS2 c.s.; 28S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium</i> sp. (коричневый)	23. 01. 2004	Casey, S.P., Bakke, T.A., Harris, P.D. and Cable, J. (Casey at all, 2003)
4	AY222087	1837	18S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium perturbatum</i>	09. 01. 2007	Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A. and Littlewood, D.T. (Olson at all, 2003)
5	AY222169	1389	28S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium perturbatum</i>	13. 06. 2003	Olson, P.D. (Olson, 2003)
6	AF184261	1259	28S рРНК p.s.	<i>Leucochloridium perturbatum</i>	06. 10. 2000	Tkach, V.V., Pawlowski, J., Mariaux, J. and Swiderski, Z. (Tkach, 2001)

*p. s. – partial sequence (частично секвенированный участок)

**c. s. – complete sequence (полный сиквенс участка)

На рисунке 15 показано расположение подобранных пар праймеров, используемых в работе для определения нуклеотидной последовательности кластера генов рРНК трематод *Leucochloridium* sp.

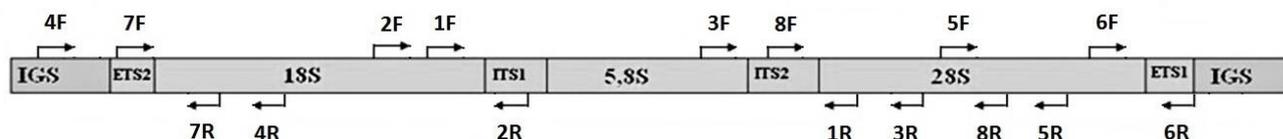


Рисунок 15. Схема расположения используемых в работе пар праймеров на участке кластера генов рРНК.

Примечания: праймеры пары №1 подобраны по последовательности фрагмента рДНК *Leucochloridium* sp. (AY258145.1) (Casey et al., 2003); дизайн праймеров № 2–5, 7 и 8 осуществляли по самостоятельно секвенированным в ходе работы участкам рДНК; праймеры № 4 и № 6 подбирали по последовательностям *Caenorhabditis elegans* (X03680) и *Schistosoma japonicum* (EU835706) соответственно.

Промоторная часть кластера, располагающаяся на 5'-конце и терминирующая часть, располагающаяся на 3'-конце нуклеотидной последовательности, входящие в состав рДНК, включены в представленную схему.

На всех ДНК, выделенных из отростков спороцист *Leucochloridium* sp., в реакциях амплификации с использованием специфических праймеров, были получены ПЦР-продукты ДНК. Размеры каждого из получаемых фрагментов находились в пределах расчетной длины, указанной в таблице 2.1 (рис.16 и 17).

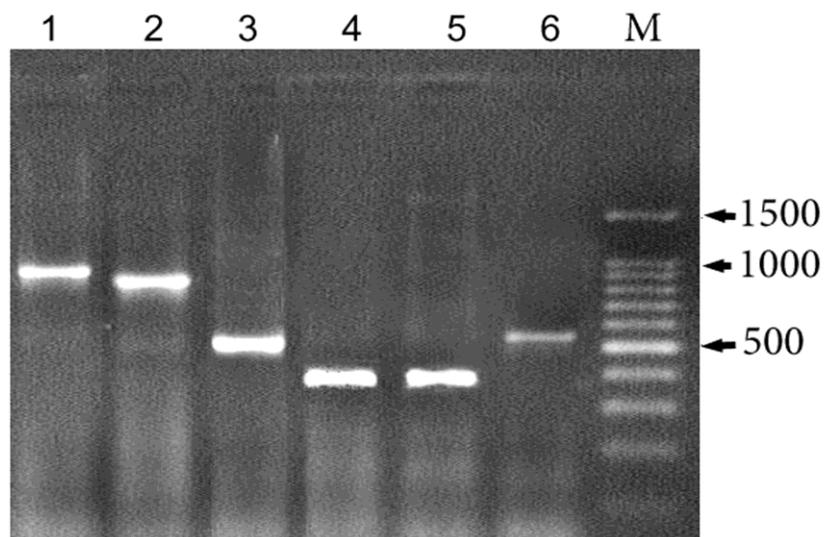


Рисунок 16. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных на рДНК из отростков спорцист *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium perturbatum*.

Примечания: 1,4% агароза. На дорожках 1 – 6 ПЦР-продукты, полученные в реакциях с парами праймеров (F-R) соответствующих номерам дорожек. М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.

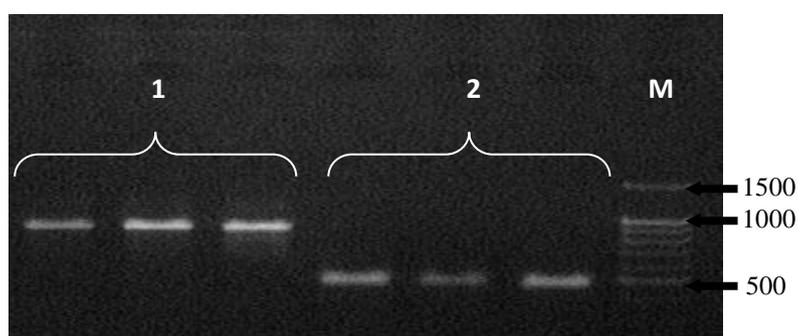


Рисунок 17. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных на рДНК из разных участков отростков спорцисты *Leucochloridium vogtianum*.

Примечания: 1,4% агароза. 1 – праймеры F1-R1; 2 – праймеры F8-R8. М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.

Полученные нуклеотидные последовательности соответствующих участков рДНК всех исследуемых образцов ДНК особей, имеющих одинаковые или различающиеся морфологические признаки, сравнивали между собой и с аннотированными в GenBank последовательностями рДНК (AY258145.1, JF346883.1, JF274482.1) с помощью программы BioEdit (прил., рис.5–7).

Сопоставление нуклеотидных последовательностей, полученных ПЦР-продуктов с последовательностями, которые служили матрицами для дизайна праймеров, показали высокую гомологию друг с другом.

Созданная в работе коллекция специфических праймеров для рДНК трематод *L. paradoxum* Carus, 1835, *L. perturbatum* Pojmanska, 1969 и *L. vogtianum* Baudon, 1881 может быть использована в дальнейшем для получения полной последовательности рДНК этих видов, а также представителей других видов рода *Leucochloridium* и трематод других групп.

3. 4. 2. Анализ нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *Leucochloridium* sp.

Трематоды вида *Leucochloridium paradoxum* характеризуются отростками спороцист зеленого цвета (рис. 5–7). Зеленый цвет может приобретать различные оттенки: от изумрудного, сине-зеленого, нефритового до оливково-зеленого цвета. Такие вариации в оттенках окраски зависят от возраста отростка спороцисты.

С помощью подобранных специфических для рДНК праймеров последовательно проводили секвенирование исследуемого участка ДНК каждого образца. Анализ секвенограмм позволил получить нуклеотидную последовательность рДНК *L. paradoxum* общей длиной 4430 п.н. (рис.1 приложения.). Нуклеотидные последовательности рДНК всех исследуемых образцов спороцист *L. paradoxum* гомологичны на 100%.

Отростки спороцист трематод *Leucochloridium perturbatum* окрашены в красно-коричневый цвет (рис. 9–11). Особенно это заметно в дистальной части такого отростка, ниже которой расположены чередующиеся кольцевые полосы белого, кремового и красно-коричневого цвета. С возрастом отростка происходит изменение его окраски на темно-коричневую.

Определенная в процессе секвенирования нуклеотидная последовательность рДНК спороцист всех исследуемых особей *L. perturbatum*, кодирующая кластер

	775	785	795	805
L.paradoxu	TCTATAAATTT	GGGTAATAAT	ATTGATTTAT	AT
L.perturba	TCTATAAATAA	GGGTAAT-TT	ATTGATTTAT	AT

Рисунок 18. Сравнение нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров кластера генов рРНК трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium perturbatum*.

Примечания: зеленым цветом выделены последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров: ITS1 и ITS2 (координаты на секвенограмме 1 – 300 и 461 – 802 соответственно). Желтым цветом выделены расхождения в нуклеотидных последовательностях. Числа над сравниваемыми последовательностями нуклеотидов указывают на позиции нуклеотидов в исследуемых секвенограммах-протоколах, полученных с праймерами F1 и R1.

В 2003 году сравнительный анализ последовательности нуклеотидов этого же участка рДНК представителей *L. paradoxum* и *L. perturbatum*, собранных на территориях Голландии, Дании и Норвегии, также выявил различие между ДНК спорцист разной окраски, составившее 6.8%. Расхождения наблюдались только в областях ITS1 и ITS2 (Casey et al., 2003). Этот факт подтверждает, что полиморфизмы внутри спейсеров закономерны при межвидовом сравнении организмов. Последовательности, кодирующие 5.8S рРНК, которые расположены между обоими участками ITS1 и ITS2, как и последовательности генов 28S РНК и 18S РНК, фланкирующие участок ITS1-5.8S-ITS2, гомологичны на 100%.

Отростки спорцист трематод *Leucochloridium vogtianum* не пигментированы и имеют бородавчатые покровы (рис. 12). Вершина отростка окрашена в темно-коричневый цвет. Представитель данного вида трематод рода *Leucochloridium* впервые был обнаружен на территории Ленинградской области в результате препарирования моллюска с множественным заражением.

Секвенированная последовательность *L. vogtianum* имеет длину 2163 п.н. (прил., рис. 3). Сравнение нуклеотидных последовательностей исследуемого участка рДНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, выявило различия не только в районе внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2). Между консервативными последовательностями 18S; 5.8S; 28S трематоды с пупырчатыми покровами и последовательностями, кодирующими эти же участки двух других видов трематод выявлены полиморфизмы (прил., рис. 6 – 7).

Последовательности, представляющие участки рДНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* аннотированы в GenBank под номерами JN639012, JN639011, KU351661 и KP938186, KP938187, соответственно.

Полученные нами данные по сравнению нуклеотидных последовательностей кодирующих и не кодирующих участков рибосомного кластера ДНК спороцист видов рода *Leucochloridium* хорошо согласуются с результатами аналогичных сравнений, полученных на трематодах, принадлежащих другим родам. Так, различия в последовательностях нуклеотидов, выявленные между представителями *Auriculostoma totonacapanensis* и *A. astyanace* (Scholz, Aguirre-Macedo, Choudhury, 2004) составили 3.6% для ITS2 рРНК, соответственно. А сравнительный анализ секвенограмм участков рДНК нескольких особей *Paracreptotrema heterandriae* послужил базой при таксономическом и филогенетическом определении этого вида (Razo-Mendivil et al., 2014b).

Межвидовой полиморфизм нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых некодирующих участков ITS1 и ITS2 между изучаемыми представителями трех видов *Leucochloridium* поддерживается соответствующими данными по другим таксонам, например, у представителей шистосом – *Trichobilharzia szidati*, *T. franki* и *T. regenti* (Dvorak et al., 2002; Rudolfova et al., 2007).

Полученные данные о межвидовом полиморфизме нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 между представителями рода Leucochloridium согласуются с результатами исследований внутренних транскрибируемых некодирующих участков трематод других родов.

3. 4. 3. Вторичные структуры последовательностей рРНК трематод рода *Leucochloridium*

Как уже отмечено в обзоре литературы, нуклеотидные последовательности, представляющие транскрибируемые, но не кодирующие модули кластера генов рРНК (ITS1 и ITS2), содержат участки, способные к формированию вторичных структур, что позволяет использовать их особенности при решении ряда практических задач сравнительной и эволюционной генетики, а также филогенетики (Schultz et al., 2005; Wolf et al., 2005; Coleman, 2007; Selig et al., 2008). Особый интерес представляет модуль ITS2. Несмотря на первоначальные впечатления, что нуклеотидные последовательности, составляющие ITS2, сильно различаются, анализ топологии вторичных структур их транскриптов выявил общую основную структуру из двух спиралей с узнаваемыми характеристиками.

Выявленные при анализе секвенограмм рДНК спороцист *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* межвидовые различия визуализированы на топологических схемах вторичных структур последовательностей нуклеотидов второго транскрибируемого спейсера.

Преобразование первичной последовательности рРНК в предполагаемую вторичную структуру проводили при помощи сервера Mfold версии 2.3, так как в этой версии программы существует возможность варьирования температуры фолдинга. Температуру фолдинга фиксировали на 20°C, так как этот показатель наиболее приближен к реальной температуре окружающей среды, а значит и температуре тела моллюска, в котором развивается спороциста *Leucochloridium* sp. При этом вторичные структуры имели самый высокий отрицательный показатель свободной энергии (dG), что говорит об их стабильности.

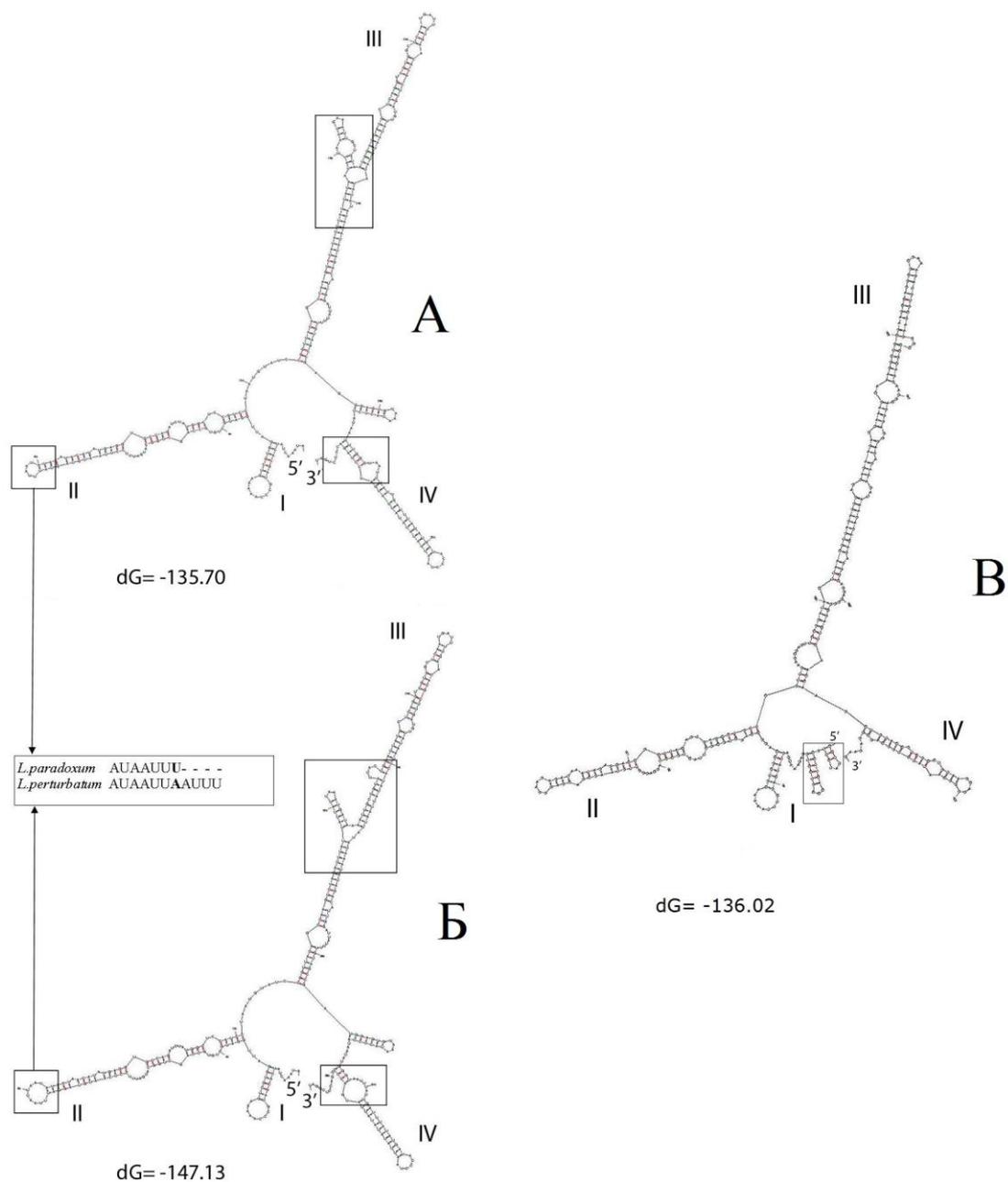


Рисунок 19. Топологические схемы вторичных структур транскриптов ITS2 трематод рода *Leucochloridium*.

Условные обозначения: А. *L. paradoxum* (327 п.н.); Б. *L. perturbatum* (339 п.н.); В. *L. vogtianum* (343 п.н.). Рамками выделены наиболее существенные отличия. dG – свободная энергия.

Видно, что графические изображения вторичных структур второго спейсера отличаются у исследуемых видов. Вместе с тем, полученные предположительные вторичные структуры участков рРНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, несмотря на наличие межвидового полиморфизма в последовательности

нуклеотидов, сохраняют характерную топологическую модель. Они имеют хорошо определяемые для участка ITS2 рРНК черты, которые являются видовыми вариациями консервативных общих характеристик подобных структур эукариот (Schultz et al., 2005). На фигурах, обозначенных на рисунке, определяются четыре спиральные шпильки (I, II, III и IV), самая длинная из них – III (рис.19). Такие же особенности структуры отмечены и у трематод других таксонов (Echinostomiformes, Plagiorchiformes, Strigeiformes, and Paramphistomiformes) (Morgan, Blair, 1998). Анализ особенностей вторичных структур ITS2 рибосомного кластера ДНК различных видов шистосом также выявил общие черты, что позволило авторам предположить, что, этот домен первичного транскрипта рДНК играет важную роль в процессе биогенеза рибосом (Michot et al., 1993).

Основные различия вторичных структур транскриптов ITS2 видов лейкохлоридиумов были локализованы на стеблях шпилек III и IV, а также концевом участке шпильки II.

Нуклеотидные последовательности участка ITS1 *L. vogtianum* и *L. paradoxum*, гомологичны между собой на 44%, а участка ITS2 – на 73%. При сравнении последовательностей *L. vogtianum* и *L. perturbatum* ITS1 оказались гомологичны на 43%, а ITS2 – на 70%. Последовательность ITS2 *L. vogtianum* имеет большее количество полиморфных сайтов, чем аналогичные последовательности *L. paradoxum* и *L. perturbatum* по отношению к друг другу. Следовательно, предположительная вторичная структура транскрипта ITS2 этого вида трематод, отличается в наибольшей степени от таковых *L. paradoxum* и *L. perturbatum*. На рисунке хорошо заметно увеличение длины шпилек за счет появления дополнительных петель, а также образование коротких шпилек на 5'-конце (рис. 19B).

Топологические схемы вторичных структур транскриптов ITS2 L. paradoxum, L. perturbatum и L. vogtianum, дали возможность визуализировать общую основную структуру из двух спиралей с узнаваемыми характеристиками,

а также видоспецифические особенности структуры (дополнительные шпильки и петли).

3. 4. 4. Характеристика полиморфизмов нуклеотидных последовательностей, входящих в кластер генов рРНК трематод рода *Leucochloridium*

Сравнение полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей участка рДНК трематод исследуемых видов – *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* – позволило продемонстрировать внутривидовую гомологию элементов рибосомного кластера ДНК этих организмов и выявить межвидовой полиморфизм внутри транскрибируемых некодирующих спейсеров у всех трех видов. Также были обнаружены некоторые изменения в консервативных, т.е. кодирующих структуру рРНК, участках рДНК этих представителей рода *Leucochloridium*.

В качестве маркера для видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium* рассматривали транскрибируемые последовательности ITS1 и ITS2. Между этими участками рДНК трематод *L. paradoxum* и *L. perturbatum* выявлены различия, в основном представленные точечными полиморфизмами (табл. 3.6).

Последовательности, кодирующие 5.8S рРНК, которые расположены между обоими участками ITS1 и ITS2, как и последовательности гена 18S и 28S РНК, фланкирующие участок ITS1-5.8S-ITS2, гомологичны на 100%. Полученные генотипические различия подтверждают правомерность выделения на основе морфологического признака окраски отростков спорцист двух видов рода *Leucochloridium*: *L. paradoxum* с зелеными отростками и *L. perturbatum* с отростками коричневого цвета.

Таблица 3.6. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium perturbatum*

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок/ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. paradoxum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	17	6	15	19
<i>L. perturbatum</i>	10	61.1/38.9	68.6/31.4				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC- пар оснований.

При выравнивании нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *L. paradoxum* и *L. perturbatum* с аналогичными последовательностями *L. vogtianum* точечные генетические полиморфизмы были выявлены не только в транскрибируемых некодирующих рРНК участках (ITS1 и ITS2), но и на участке генов 5.8S и 28S рРНК из *L. vogtianum* (табл. 3.7–3.9). В приложениях приведены полные секвенированные участки последовательностей, содержащие полиморфизмы (прил., рис.5–6). Гомология нуклеотидных последовательностей рДНК *L. vogtianum* с таковыми *L. paradoxum* составила 94.7%, в то время как с *L. perturbatum* – 95.4%.

Таблица 3.7. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей, кодирующих участки 18S, 5.8S и 28S трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium vogtianum*.

Вид	N	Кол-во замен			Кол-во вставок/ делеций		
		18S	5,8S	28S	18S	5,8S	28S
<i>L. paradoxum</i>	18	4	1	7	2	0	0
<i>L. vogtianum</i>	1						

Примечание: N – число последовательностей.

Таблица 3.8. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium vogtianum*.

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок/ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. paradoxum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	20	31	4	27
<i>L. vogtianum</i>	1	61.9/38.1	63.9/36.1				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC-оснований.

Таблица 3.9. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 трематод *Leucochloridium perturbatum* и *Leucochloridium vogtianum*.

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок\ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. perturbatum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	7	12	28	50
<i>L. vogtianum</i>	1	61.9/38.1	63.9/36.1				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC-оснований.

Факт выявления полиморфизмов на консервативных участках рДНК между видами одного рода трематод представляет интерес, так как эти участки являются маркерными при сравнении более высоких таксономических рангов, таких, как отряд, семейство и т. п. Данные о наличии подобных различий в последовательностях нуклеотидов консервативных доменов рибосомного кластера у представителей одного рода и даже вида хотя и представлены в литературе, но являются, скорее, исключением, чем правилом. Их можно объяснить внутривидовой изменчивостью. Так, ученые из Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток) описали обнаруженные полиморфизмы для 28S рРНК (0.5%), выявленные между тремя разными популяциями трематод *Skrjabinolecithum spasskii* (Беспрозванных В.В. и др., 2015). Полиморфизм участка 28S рРНК между представителями одного рода: *Auriculostoma totonacapanensis* и *A. astyanace* (Scholz, Aguirre-Macedo, Choudhury, 2004) составил 2.0%. А различия

последовательностей участка, кодирующего 28S рРНК трематод *Auriculostoma* spp. и представителей 7 других родов Allostreadiidae, составляют от 2.4 до 6.3% (Razo-Mendivil et al., 2014a).

*Анализ нуклеотидных последовательностей, входящих в состав кластера генов рРНК трех видов трематод рода Leucochloridium выявил полиморфизмы как в традиционно признанных полиморфными участках: ITS1 и ITS2, так и внутри консервативных последовательностей, кодирующих структуру 18S, 5.8S и 28S рибосомных РНК. Показано, что полиморфизмы во внутренних транскрибируемых последовательностях являются результатом замен, делеций и вставок нуклеотидов (табл. 3.6, 3.8 и 3.9). В случае последовательностей, кодирующих консервативные домены кластера: 18S, 5.8S и 28S, сравнение секвенограмм *L. paradoxum* и *L. vogtianum* позволило обнаружить только 2 изменения типа делеция/вставка в гене 18S, остальные полиморфизмы были результатами замен нуклеотидов в генах 18S, 5.8S и 28S РНК в количестве 4, 1 и 7 замен соответственно (табл. 3.7). Эти данные позволяют приступить к филогенетическому анализу исследуемых объектов.*

3. 5. Филогенетический анализ трематод рода *Leucochloridium*

Работ по исследованию филогенетических связей трематод внутри рода *Leucochloridium*, основанных на данных молекулярно-генетических исследований, в литературе нет. На настоящий момент определенные в нашей работе нуклеотидные последовательности кластера генов рибосомных ДНК длиной 4444 п.н. (*L. perturbatum*), 4430 п.н. (*L. paradoxum*) и 2163 п.н. (*L. vogtianum*) являются наиболее протяженными секвенированными участками хромосомной ДНК трематод рода *Leucochloridium* из аннотированных в базах GenBank. Они включают кодирующие (18S, 5.8S и 28S) и не кодирующие (ITS1 и ITS2) участки исследуемого кластера генов, являющегося единицей транскрипции рРНК. Для определения таксономического статуса трематод внутри рода использовали нуклеотидные последовательности участка ITS1, ITS2, а также участок ITS1-5.8S-

ITS2. Более широкую реконструкцию филогенетических отношений между видами трематод рода *Leucochloridium* и представителями других родов трематод («внешние группы») осуществляли на основании результатов секвенирования участков рДНК, которые кодируют 18S и 28S рРНК. Нуклеотидные последовательности для внешних групп брали из базы GenBank (табл. 4). Ключевым критерием выбора была полнота участка рДНК.

На рисунках (рис. 20 – 31) представлены неукорененные деревья, полученные при помощи метода ML (максимального правдоподобия) и метода MP (максимальной экономии) с помощью программы Mega v.3.0. Модель для расчета генетических дистанций перед построением определялась с помощью программы Modeltest. По результатам тестирования оптимальной была признана двупараметрическая модель Кимуры с использованием гамма-коррекции (Kimura, 1980). Цифрами на рисунках отмечены бутстрэпные (статистические) значения поддержки соответствующих ветвей. Для анализа в качестве предварительного контрольного древа использовали схему, полученную с помощью дистанционного метода NJ (метод ближайшего соседа). С использованием различных методов были получены идентичные по топологии деревья.

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности трематод «внешних групп», используемые для построения дендрограмм.

Таксоны	Индекс в GenBank	Участок рибосомного кластера
Сем. Strigeidae		
<i>Strigeidae sp.</i>	AY245711	ITS1
<i>Strigeidae sp.</i>	AY245711.1	ITS1; 5,8S
<i>Apotemon gracilis</i>	AJ301893.1	ITS2
<i>Apharyngostrigea cornu</i>	AY222092	18S
<i>Apharyngostrigea cornu</i>	AF184264.1	28S
<i>Apharyngostrigea pipientis</i>	AY245757.1	18S
<i>Apharyngostrigea pipientis</i>	JF820597.1	28S
<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	AJ287526	18S
<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	AY222172	28S
<i>Cardiocephaloides longicollis</i>	AY222089	18S
<i>Cardiocephaloides longicollis</i>	AY222171.1	28S
<i>Nematostrigea serpens</i>	KF434762.1	28S
Сем. Cyathocotylidae		
<i>Holostephanus dubinini</i>	AY245707.1	ITS1; 5,8S
<i>Cyathocotylidae sp.</i>	HQ219207.1	ITS2
Сем. Plagiorchiidae		
<i>Plagiorchiidae sp.</i>	AY245700.1	ITS1; 5,8S
<i>Aptorchis pearsoni</i>	EF014728.1	ITS1; 5,8S; ITS2
<i>Aptorchis aequalis</i>	EF014729.1	ITS1; 5,8S; ITS2
<i>Aptorchis megacetabulus</i>	EF014730.1	ITS1; 5,8S; ITS2
<i>Aptorchis glandularis</i>	EU334367.1	ITS1; 5,8S; ITS2
<i>Aptorchis sp.</i>	AM 932523.1	ITS2
Сем. Echinostomatidae		
<i>Echinostoma liei</i>	U58099.2	ITS1; 5,8S; ITS2
Сем. Fasciolidae		
<i>Fasciolidae hepatica</i>	AJ628432.1	ITS1
<i>Fasciolidae hepatica</i>	JN828960.1	ITS1; 5,8S; ITS2
Сем. Leucochloridiidae		
<i>Urogonimus macrostomus</i>	AY222086	18S
<i>Urogonimus macrostomus</i>	JQ774502.1	28S
Сем. Schistosomatidae		
<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>	AY157222.1	18S
<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>	AY157248	28S
<i>Schistosoma japonicum</i>	AY157226	18S
<i>Schistosoma japonicum</i>	JF721395.1	28S
<i>Schistosoma haematobium</i>	Z11976.1	18S
<i>Schistosoma haematobium</i>	Z46521	28S
<i>Schistosoma mansoni</i>	M62652.1	18S
<i>Schistosoma mansoni</i>	Z46503.1	28S
<i>Trichobilharzia franki</i>	KJ775867	28S
<i>Schistosoma japonicum</i>	KM023790.1	ITS1; 5,8S; ITS2
Сем. Dicrocoeliidae		
<i>Dicrocoelium chinensis</i>	KF734795	ITS1; 5,8S; ITS2
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	KC774524	ITS1; 5,8S; ITS2

ITS1. Выбор этого участка рДНК в качестве маркера позволяет продемонстрировать взаимоотношения видов трематод *Leucochloridium* sp., внутри рода. В качестве внешних групп были взяты такие семейства, как: Cyathocotylidae, Strigeidae, Plagiorchiidae, Echinostomatidae, Fasciolidae и Schistosomatidae. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей ITS1 при помощи метода ML, представлено на рисунке 20А. В качестве предварительного контрольного дерева для анализа использовали метод NJ (рис. 20Б). Идентичность топологии полученных схем подтверждает корректность выбранной модели. Проведенный анализ нуклеотидов, находящихся в филогенетически информативных позициях последовательностей с помощью метода максимальной экономии, подтвердил таксономическое положение изучаемой группы (рис. 20В).

Полученные нами последовательности ITS1 трематод рода *Leucochloridium* объединены в одну кладу. Разделение на три ветви с высокими узловыми статистическими поддержками указывает на достоверную генетическую дифференциацию между видами. При этом *Leucochloridium vogtianum* ответвляется от общей ветви раньше.

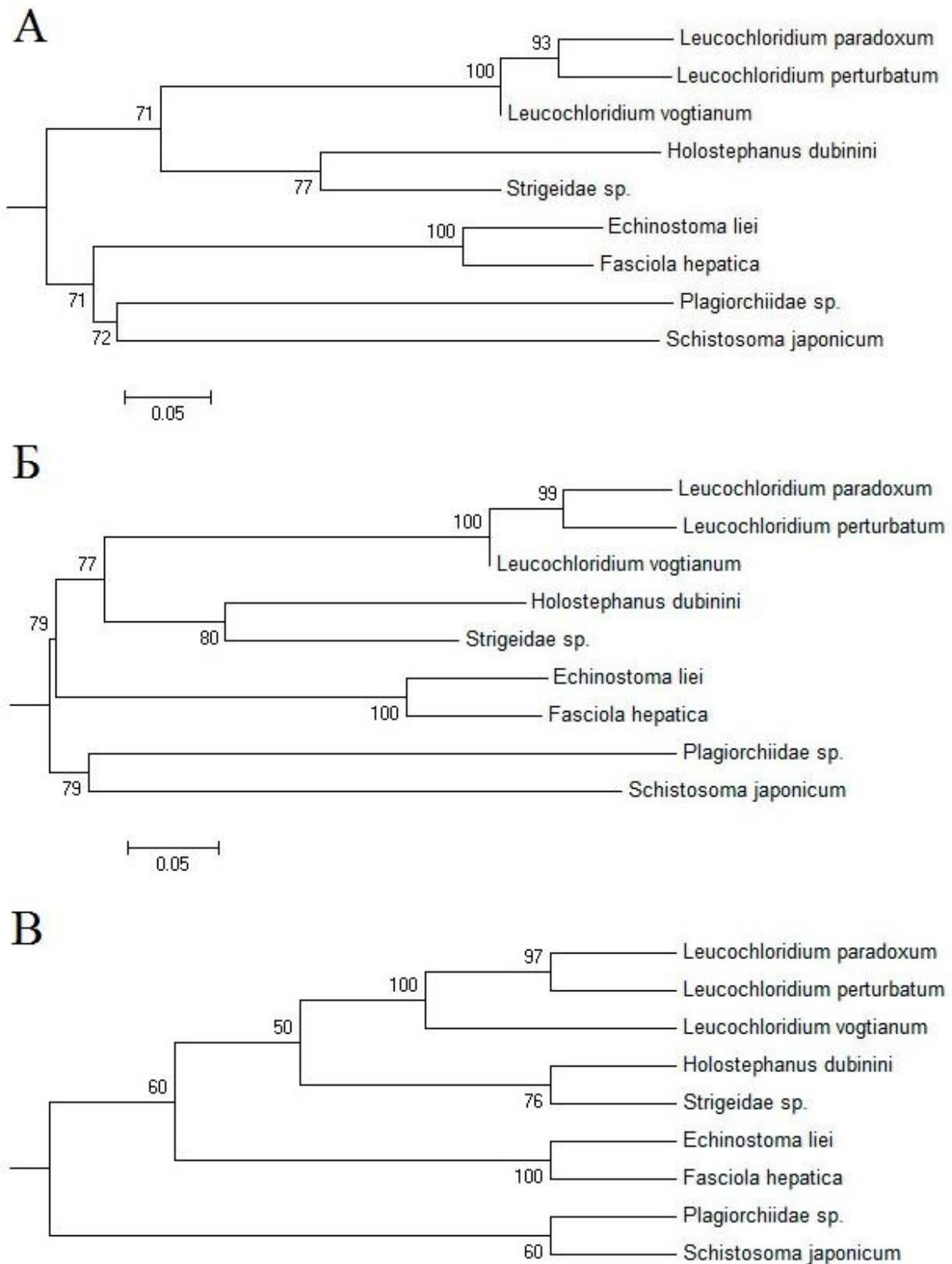


Рисунок 20. Филогенетические деревья, построенные по нуклеотидным последовательностям ITS1 представителей сем. Leucochloridiidae совместно с внешними группами.

Условные обозначения: А – метод ML; Б – метод NJ; В – метод MP. Цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

На рисунке видно, что Echinostomatidae и Fasciolidae объединились в одну кладу с высокой бутстрэпной поддержкой. Вероятно, это связано с тем, что оба этих семейства весьма близки и принадлежат к одному отряду Echinostomatoidea. Представители семейств Cyathocotylidae и Strigeidae относятся к надсемейству Diplostomoidea отряда Strigeidida, и также объединены в одну кладу. Семейства Plagiorchiidae и Schistosomatidae относятся к разным отрядам трематод. Их объединение в одну кладу, вероятно, не валидно из-за недостаточной выборки, а также использования в качестве маркера участка ITS1, достоверно показывающего отношения организмов на низком таксономическом уровне – внутри семейства, рода. Систематические связи трематод на уровне высоких рангов таксонов будут рассмотрены ниже при использовании более подходящих маркеров.

Построенные деревья по последовательностям первого транскрибируемого спейсера с помощью различных методов показали одинаковые результаты, что доказывает надежность полученной схемы.

ITS2. Филогенетические деревья, построенные по последовательностям ITS2, представлены на рисунке 21. Лейкохлоридиумы представлены хорошо выделенной ветвью и кладой с высокой статистической узловой поддержкой. Хорошо заметно, что *L. vogtianum*, как и на схемах, построенных по ITS1, имеет более значительную эволюционную дистанцию по отношению к двум другим видам в своем роде, чем *L. perturbatum* и *L. paradoxum* относительно друг друга.

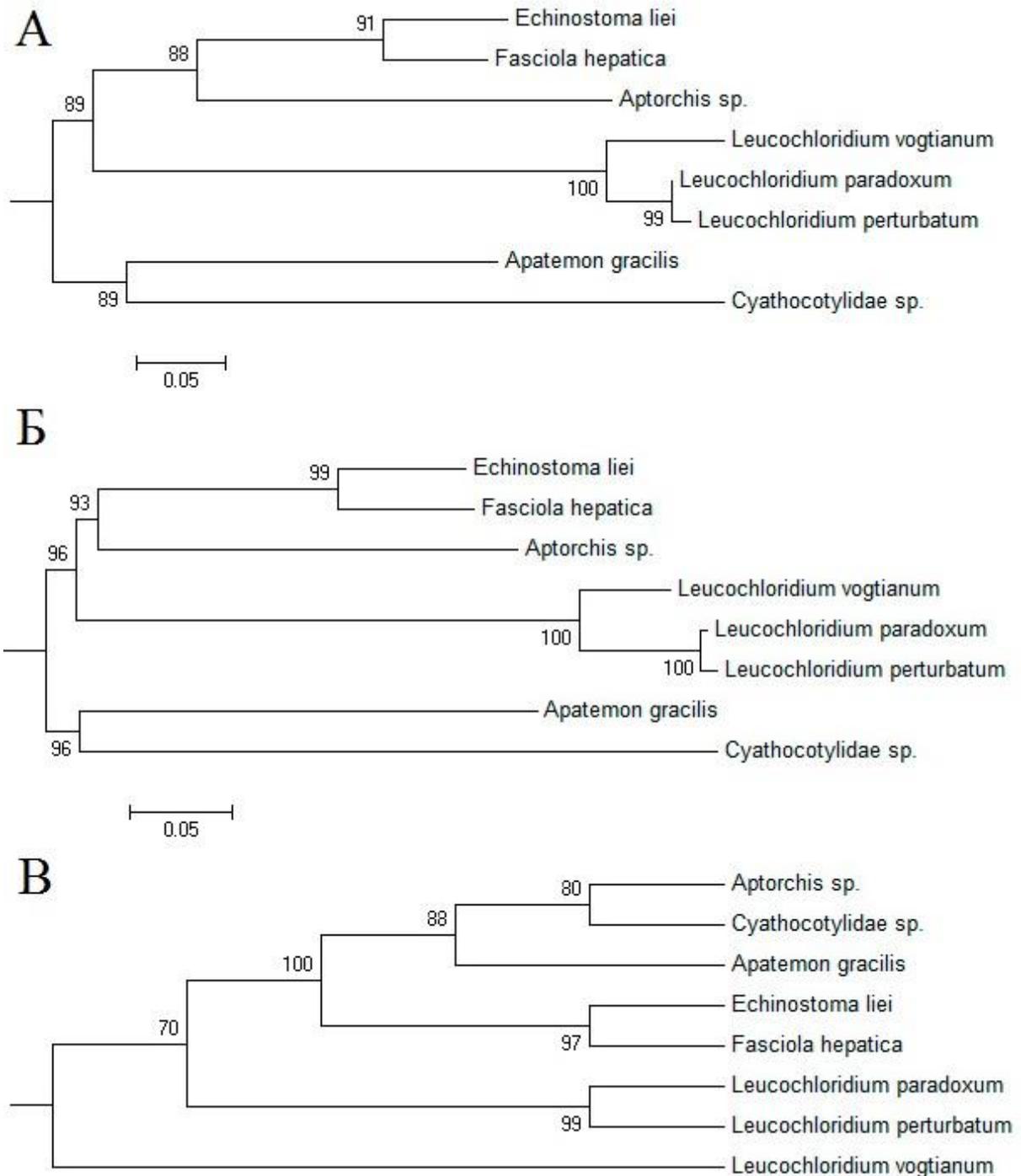


Рисунок 21. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS2 представителей сем. Leucochloridiidae совместно с внешними группами.

Условные обозначения: А – метод ML; Б – метод NJ; В – метод MP. Цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

Схема, полученная с помощью модели NJ (рис. 21Б) полностью совпадает со схемой, представленной выше (рис. 21А). Первая четко выделяемая клада

содержит представителей семейств, относящихся к одному отряду Plagiorchiida (*Echinostoma liei*, *Fasciola hepatica* и *Aporchis* sp.) Внутри этой клады хорошо дифференцированы два надсемейства: Echinostomatoidea (сем. Echinostomatidae, сем. Fasciolidae) и Plagiorchioidea (сем. Plagiorchiidae). Отряд Strigeidida, в составе двух семейств, представляет третью кладу. На схеме, полученной с помощью метода максимальной экономии (рис. 21B) таксономически группы сгруппировались аналогично деревьям, построенным двумя другими методами. Интересно, что длина ветви *L. vogtianum* превышает все остальные, что говорит о содержании наибольшего числа замен, по отношению с другими последовательностями.

Чем больше нуклеотидов в последовательности маркерных участков на основании которых строятся филогенетические связи, тем выше достоверность полученных данных. Поэтому для подтверждения показанного выше таксономического статуса трематод рода *Leucochloridium* было дополнительно сконструировано дерево, основанное на более полной нуклеотидной последовательности: ITS1-5.8S-ITS2 (рис. 22–24).

ITS1-5.8S-ITS2. Филогенетическая схема, построенная на основе последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 демонстрирует аналогичное положение трематод рода *Leucochloridium* таксонам дерева, построенного по последовательностям транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2). Для построения использовались те же семейства, что и для схем представленных выше, а также семейство Dicrocoeliidae. Все три дерева, построенные с помощью различных методов, демонстрируют одинаковую топологию таксономических группировок.

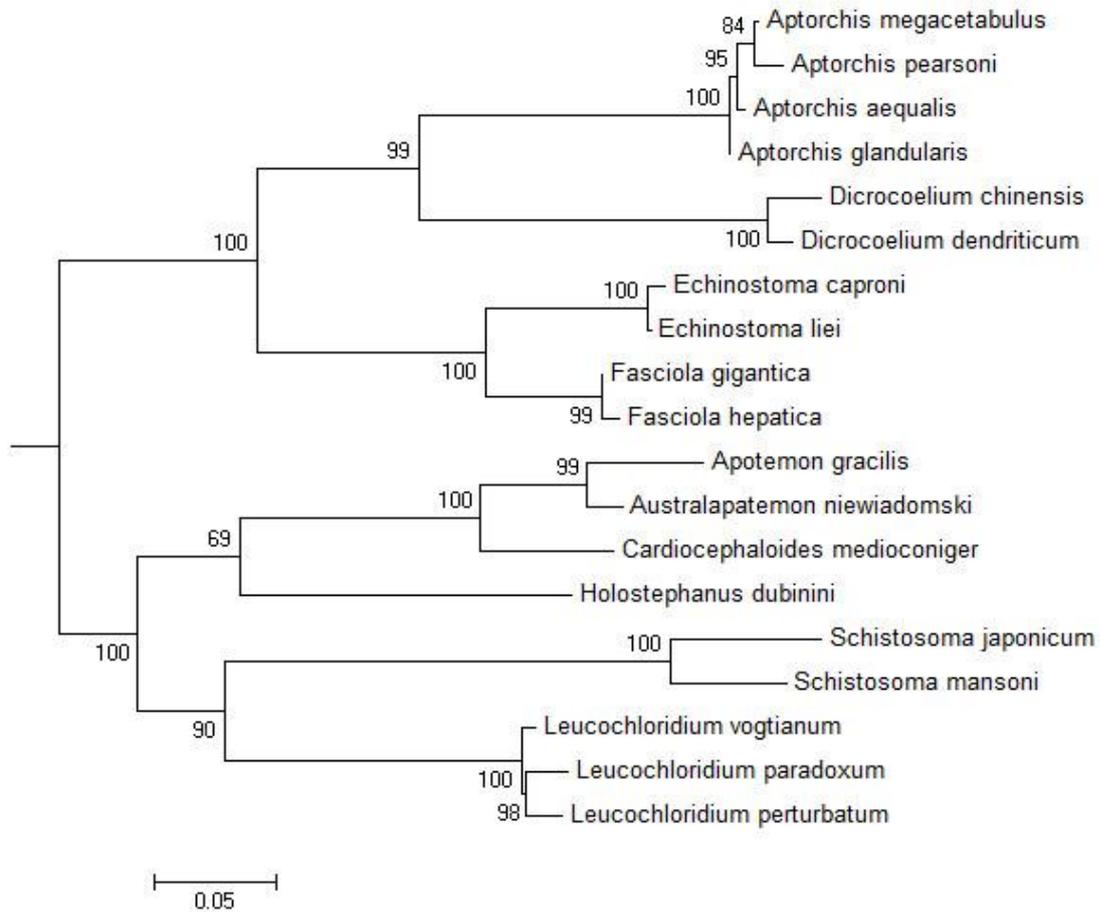


Рисунок 22. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-5.8S-ITS2 представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом ML.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

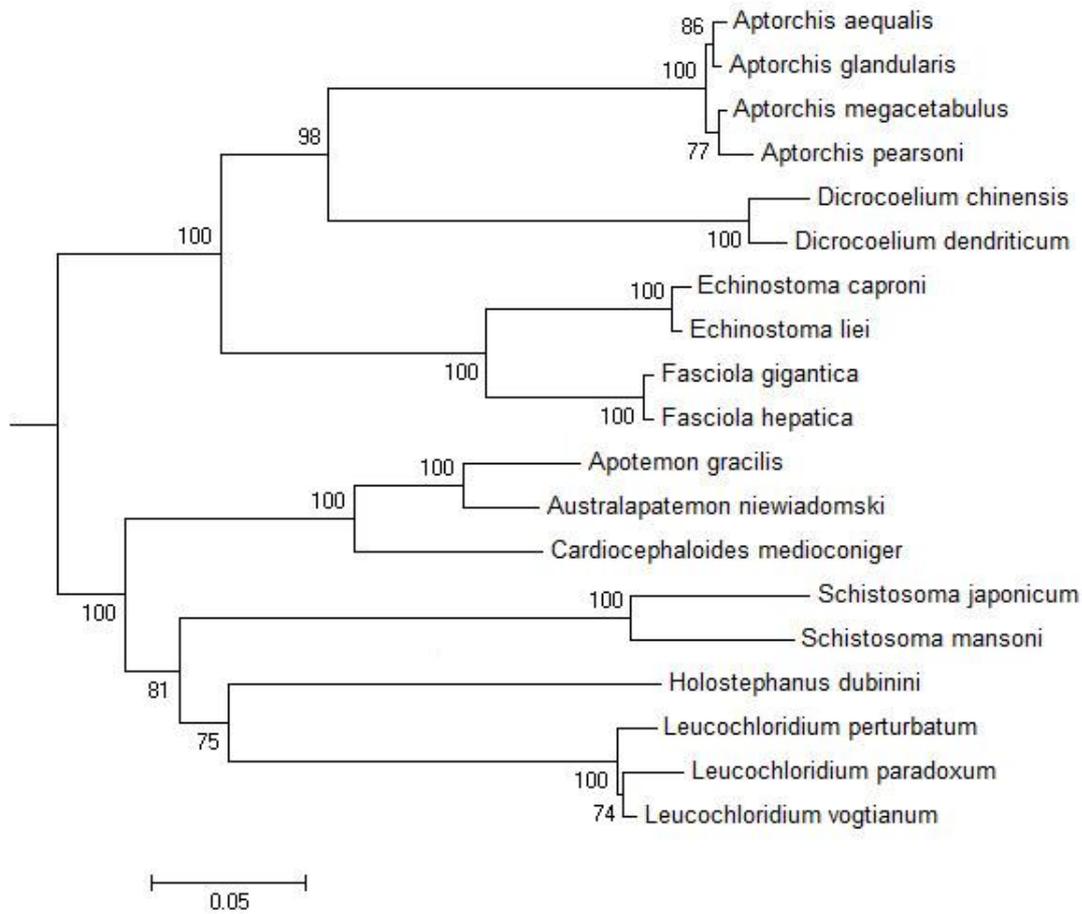


Рисунок 23. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-5.8S-ITS2 представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом NJ.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

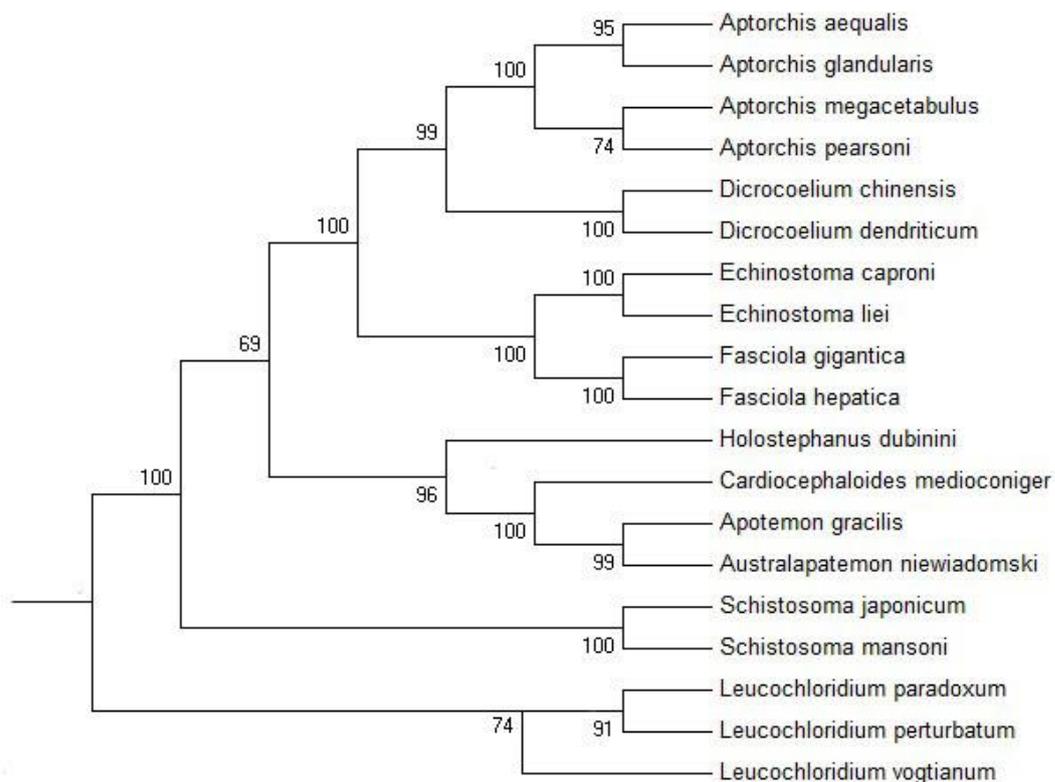


Рисунок 24. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-5.8S-ITS2 представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом MP.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

В целом статистическая поддержка филогенетических конструкций, построенных по нуклеотидным последовательностям участка ITS1-5.8S-ITS2, достаточно высокая, и в большинстве случаев составляет 98 – 100.

Полученные нами схемы подтверждают таксономические данные о семействе Leucochloridiidae, представленные в классической системе трематод Олсона, основанной как на морфологических признаках, так и на молекулярно-генетических критериях (Olson, 2003), а также в общепринятой классификации на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

18S рДНК. На дереве, построенном по нуклеотидным последовательностям консервативного участка рибосомного кластера, который кодирует последовательность 18S рРНК методом ML четко выделяются три клады: сем. Leucochloridiidae, сем. Schistosomatidae и сем. Strigeidae (рис. 25). Показатели

бутстрэпной поддержки этих клад максимальные – не ниже 99, несмотря на достаточно большой разброс статистических значений внутри семейств. Внутри клады семейства *Leucochloridiidae* видна четкая дифференциация двух родов: *Leucochloridium* и *Urogonimus*, также с высоким узловым значением.

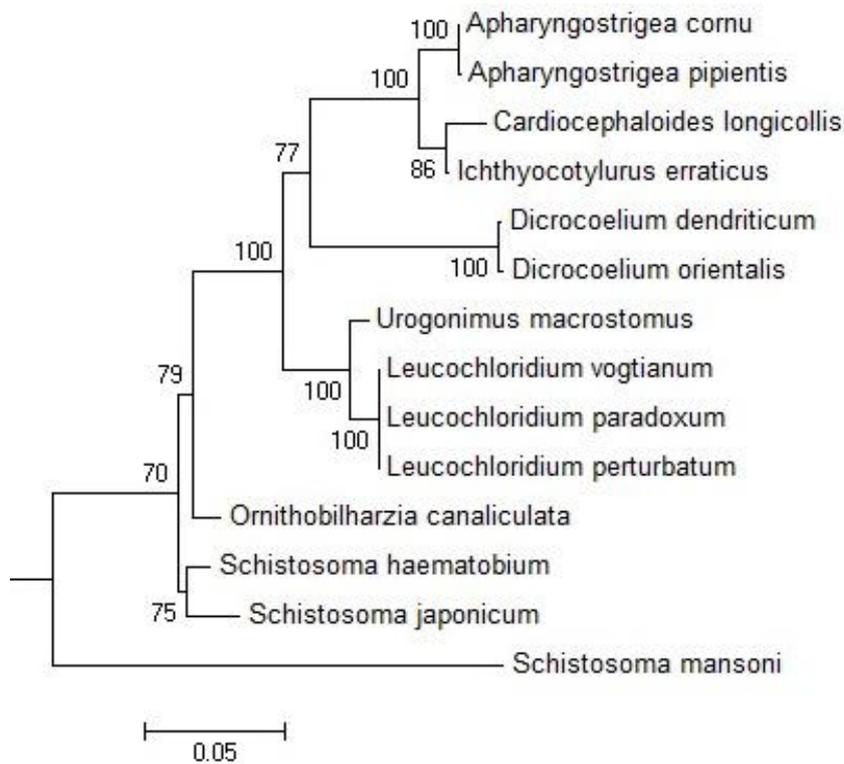


Рисунок 25. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 18S представителей семейства *Leucochloridiidae* совместно с внешними группами методом ML.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

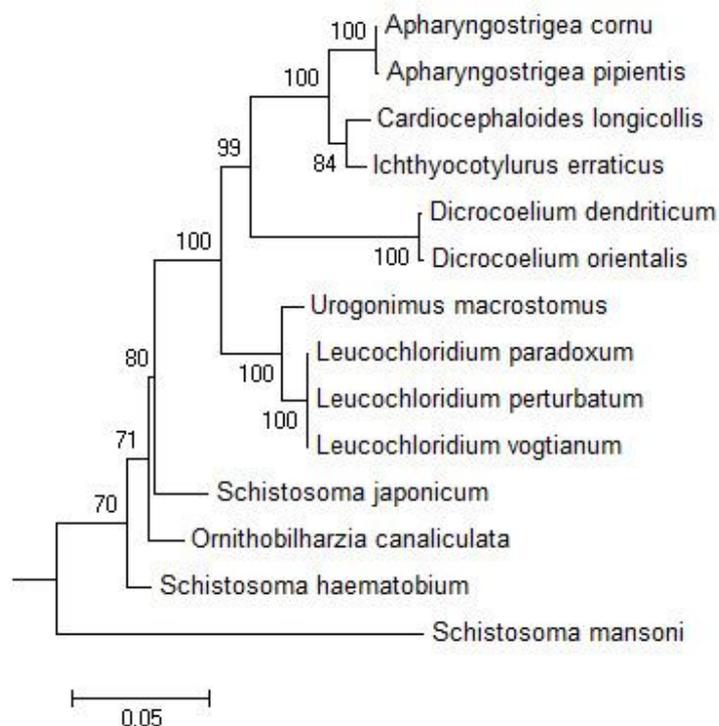


Рисунок 26. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 18S представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом NJ.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

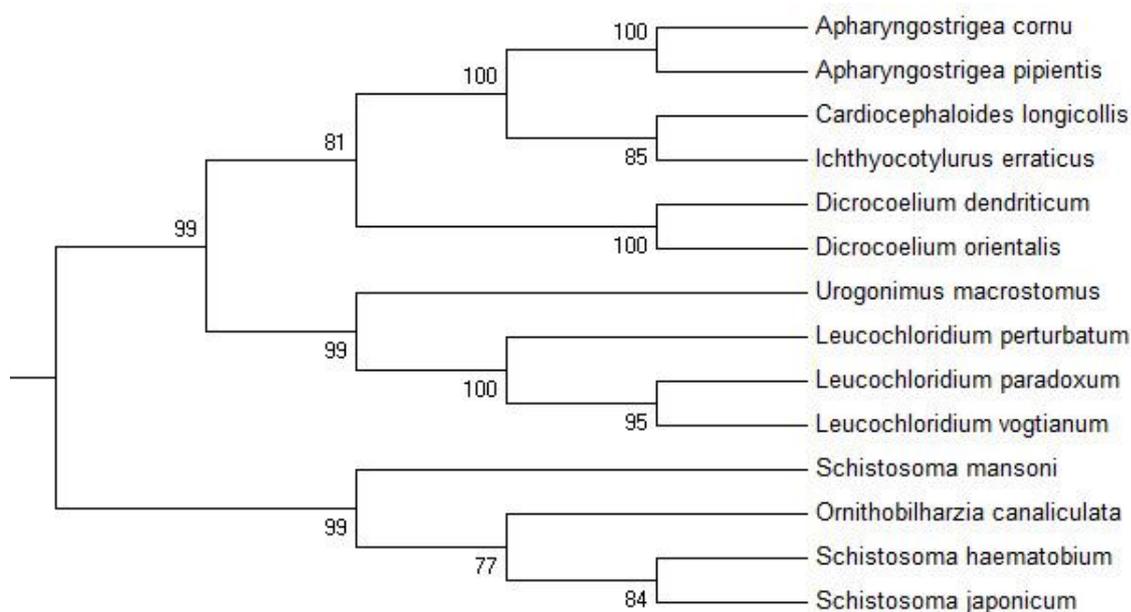


Рисунок 27. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 18S представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом MP.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

Полученные результаты подтверждают объективность использования последовательности 18S в качестве маркера трематод для таксономических категорий высокого ранга, таких, как семейства. Также, за счет высокой бутстрэпной поддержки, подтверждается самостоятельное положение *Leucochloridiidae* среди других семейств трематод.

28S рДНК. При построении деревьев на основании секвенограммы участка рДНК, кодирующего 28S рРНК, в качестве внешних групп для *Leucochloridiidae* брали те же семейства, что и при построении дерева по 18S: *Schistosomatidae*, *Strigeidae* и *Dicrocoeliidae* (рис. 28–30). На рисунках, построенных методами ML и NJ, хорошо выделяются четыре клады, соответствующие семействам с высокой статистической поддержкой. Внутри семейства *Leucochloridiidae* четко выделяются два рода: род *Leucochloridium* и род *Urogonimus* с бутстрэпным значением 99. Внутри клады семейства *Strigeidae* также можно отметить четкую родовую дифференциацию, поддержанную значениями не ниже 86: род *Apharyngostrigea*, род *Nematostrigea*, род *Ichthyocotylurus*, род *Cardiocephaloides*. Семейство *Dicrocoeliidae* объединяет двух представителей одного рода. Шистосоматиды надежно разделились на три рода: *Trichobilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Schistosoma*.

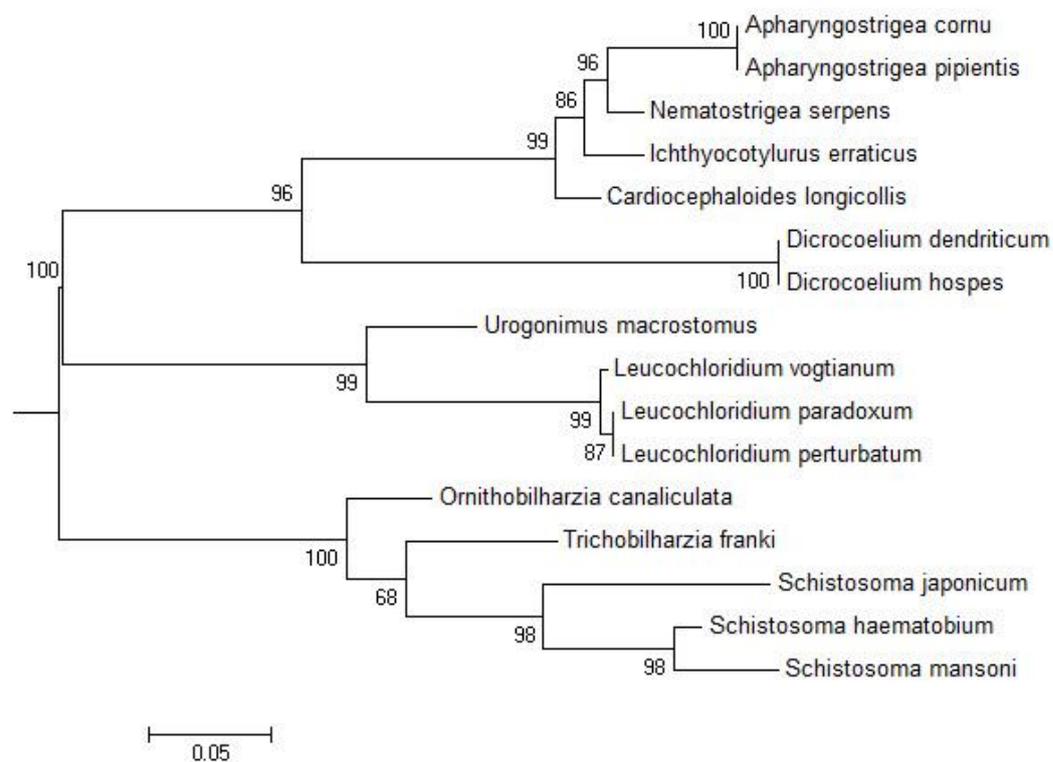


Рисунок 28. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 28S представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом ML.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

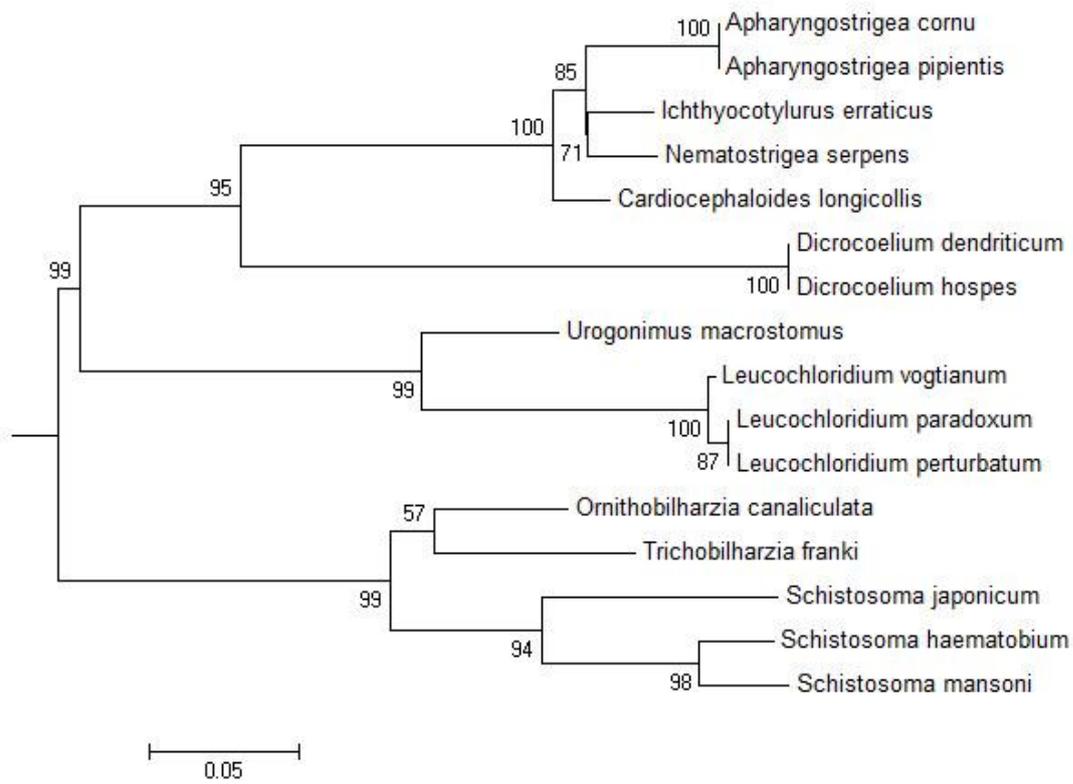


Рисунок 29. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 28S представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом NJ.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

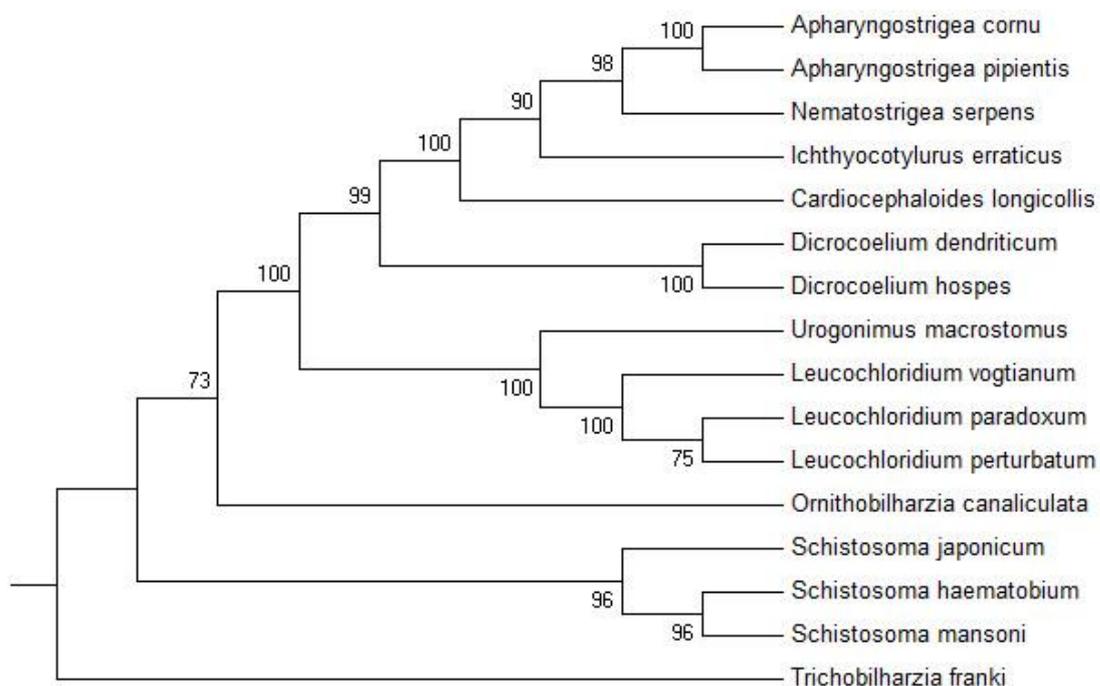


Рисунок 30. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям 28S представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом MP.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

На филогенетическом дереве, построенном с помощью метода максимальной экономии по тем же последовательностям, можно выделить те же клады, что и на рисунках, представленных выше. Неожиданным оказалось то, что *Trichobilharzia franki* была вынесена в отдельную ветвь (рис. 30). Но так как узловая бутстрэпная поддержка отсутствует, можно сделать вывод, что такое построение связано с недостаточными статистическими данными, является недостоверным и не представляет научного интереса. Этот факт никаким образом не влияет на выводы представленной работы.

Таким образом, все использованные нами молекулярные маркеры рибосомного кластера, с одной стороны, подтверждают справедливость используемых для видовой идентификации лейкохлоридиумов морфологических признаков, с другой – четко определяют систематическое положение рода в системе трематод.

Полученные нами результаты соответствуют классическим представлениям о систематике трематод. Согласно классификации академика К. И. Скрябина (Скрябин, 1948) род *Leucochloridium* относится к семейству Brachylaemidae:

Надсемейство Fascioloidea Stiles et Goldbegr, 1910

Семейство Brachylaemidae Stiles et Hassal, 1898

Подсемейство Leucochloridiinae Sinitsin, 1981

Род *Leucochloridium* Carus, 1835

В дальнейшем эта классификация, основанная на морфологических признаках, была подтверждена молекулярно-генетическими данными. Изменения претерпели лишь категории таксонов. Согласно классификации Олсона (Olson, 2003) род *Leucochloridium* относится к надсемейству Brachylaimoidea, семейству Leucochloridiidae.

Вышеописанные классификации были основаны в основном на морфологических признаках и молекулярных маркерах гермафродитного поколения трематод. Полученные нами данные показывают возможность использования партенит рода *Leucochloridium* для достоверной молекулярной видовой идентификации.

Данные молекулярно-генетических исследований, представленные в базе NCBI относят род *Leucochloridium* к порядку Strigeidida, и к самостоятельному семейству Leucochloridiidae. Данное семейство включает в себя два рода: *Leucochloridium* и *Urogonimus*. Род трематод *Urogonimus* содержит один вид – *Urogonimus macrostomus*. Род *Leucochloridium* включает два вида: *L. paradoxum* и *L. perturbatum*.

Филогенетические построения с использованием нетранслируемых нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 и консервативных участков рибосомного кластера, кодирующих рРНК подтвердили видовой ранг исследуемых форм рода *Leucochloridium*. По результатам филогенетического анализа, исследуемые нами особи относятся к трем разным видам в соответствии с их морфологической видовой идентификацией. При этом виды

лейкохлоридиума кластеризуются в отдельную кладу, соответствующую сем. Leucochloridiidae.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы была создана коллекция специфических праймеров, позволяющая при необходимости амплифицировать и секвенировать нужный фрагмент рибосомного кластера трематод. Ее использование позволило не только секвенировать большую часть рибосомного кластера трех видов трематод рода *Leucochloridium*, но и проанализировать большое количество образцов ДНК, в том числе полученных из спороцист, обнаруженных в моллюсках в разных географических точках. И наоборот, разработанная методика позволила индивидуально генотипировать образцы спороцист, извлеченные из одного моллюска.

В результате осуществленного в работе генотипирования были получены протяженные участки рДНК трематод рода *Leucochloridium* трех видов – *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum*. Расшифрованные нуклеотидные последовательности включают как консервативные последовательности генов 18S, 5.8S и 28S рДНК, так и переменные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных между ними. Общее количество секвенированных фрагментов рДНК включает 42 образца. Полученные участки рДНК являются наиболее полными для трематод семейства Leucochloridiidae из представленных в настоящее время в GenBank.

Нами не было обнаружено никаких внутривидовых полиморфизмов на протяжении секвенированных фрагментов ДНК рибосомного кластера. При этом выявленные межвидовые полиморфизмы в нуклеотидных последовательностях рДНК полностью подтвердили видовой статус трех исследуемых видов – *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum*. Различия в области ITS2 оказались достаточными для формирования отличий на вторичных структурах их транскриптов.

Параллельно с анализом рДНК нами был разработан алгоритм генотипирования исследуемых видов с помощью RAPD-анализа. Выявлены

видоспецифические профили амплифицированных фрагментов, получаемых с 10-нуклеотидным праймером (G8), по которым представители видов *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum* достоверно отличаются между собой.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа спороцист трематод рода *Leucochloridium* из моллюсков *Succinea putris* позволяют достоверно отнести их к трем видам: *Leucochloridium perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum*. В то же время, полученные данные подтвердили объективность видовой идентификации этих паразитов по морфологическим признакам – форме, цвету и характеру окраски отростков спороцист.

Для зрелых отростков спороцист *L. paradoxum* характерно наличие зеленого пигмента в тегументе, для *L. perturbatum* – коричневого пигмента с участками светлых и темных чередующихся полос, а отростки спороцист *L. vogtianum* содержат пигмент желтого цвета и несут папилломообразные выросты.

Разработанный алгоритм молекулярно-генетического анализа может быть использован для верификации незрелых инвазий, когда отсутствуют сформированные отростки. Кроме того, такой анализ необходим при изучении случаев множественного заражения моллюсков трематодами рода *Leucochloridium*. Следовательно, его применение позволяет выполнять более объективный анализ зараженности сукциней этими паразитами, что особенно важно при изучении сезонной динамики инвазии улиток.

Также предложенный алгоритм поможет решить проблему двойственной классификации данного рода трематод (по церкариям и маритам), так как генотипирование по надежным маркерам позволит точно определить принадлежность разных фаз жизненного цикла к одному или разным видам.

Полученные в работе нуклеотидные последовательности были использованы для филогенетических построений с использованием в качестве внешних групп трематод нескольких семейств, нуклеотидные последовательности рДНК которых представлены в открытых базах данных. С использованием нескольких алгоритмов были получены филогенетические деревья схожей

топологии. Во всех случаях в филогенетической реконструкции на основе участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК исследуемые виды – *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum* – кластеризуются в общую ветвь единого рода. При этом наиболее близкими друг к другу видами оказались *L. perturbatum* и *L. paradoxum*, линия с *L. vogtianum* на всех реконструкциях ответвляется раньше. Построения с использованием консервативных фрагментов, кодирующих 18S и 28S рДНК, подтверждают принадлежность рода *Leucochloridium* к семейству Leucochloridiidae, входящему в состав надсемейства Brachylaimoidea.

Правомочность помещения исследуемых видов в род *Leucochloridium* подтверждена с использованием маркеров рДНК и митохондриальных генов. При этом изучался материал, собранный в Польше и Чехии (Heneberg et al., 2016). Однако в этой работе более близкими на реконструкции оказываются виды *L. paradoxum* и *L. vogtianum*, тогда как *L. perturbatum* ответвляется от общей ветви немного раньше. Кроме того, результаты построений на основе различных фрагментов генома различаются. Вероятно, эти отличия объясняются тем, что во всех случаях для филогенетических построений были использованы менее протяженные фрагменты генома – неполный фрагмент ITS2 и небольшой участок гена 18S отдельно друг от друга.

Построенная нами с использованием ядерных маркеров рДНК схема определяет расположение рода *Leucochloridium* среди других трематод (рис. 31). В целом она соответствует известной классификации Олсона (Olson et al., 2003) выполненной с использованием молекулярно-биологических данных. В то же время, построенная нами с помощью молекулярных маркеров схема во многом подтверждает справедливость классической системы Кэйбла (рис.3).

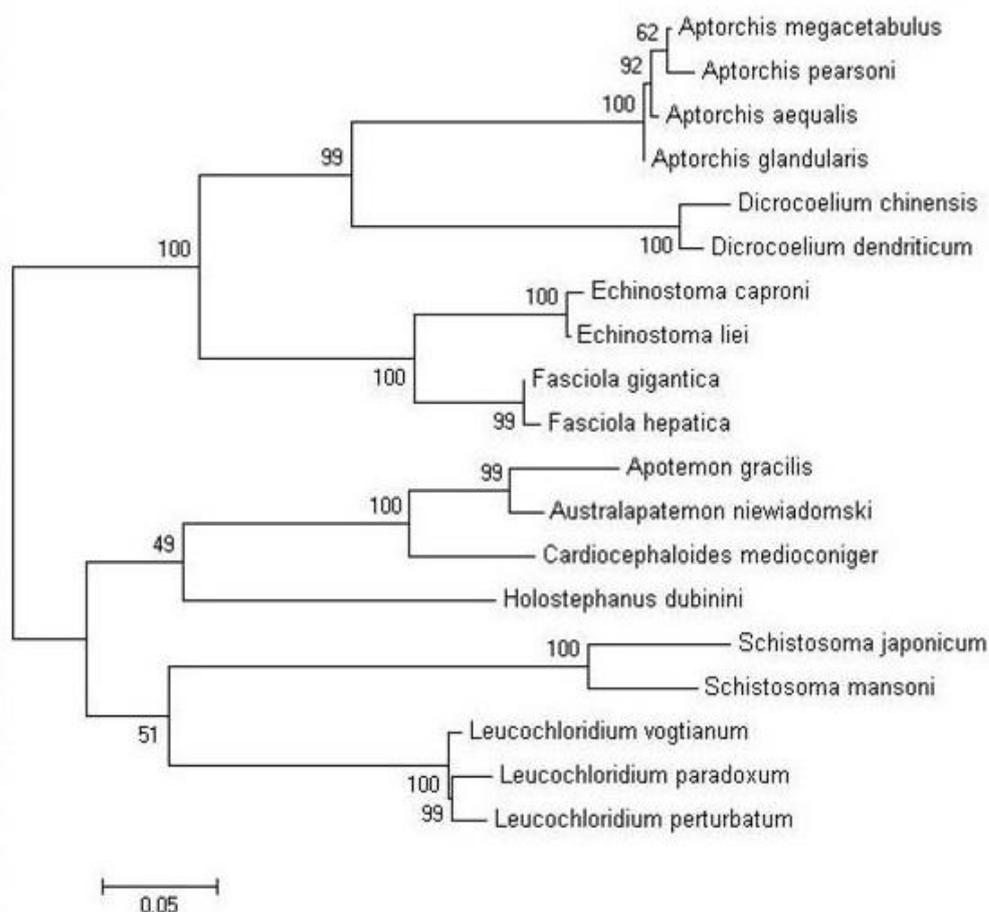


Рисунок 31. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-5.8S-ITS2 представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом ML.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

В процессе выполнения исследования нам удалось обнаружить различные комбинации двойной инвазии моллюсков *Succinea putris* спороцистами рода *Leucochloridium*. Множественное заражение моллюсков трематодами – широко распространенное явление в природе (Combes, 1995), но слабо изученное экспериментально. Тем не менее, известно, что двойные инвазии могут быть представлены зрелыми инфрапопуляциями партенит обоих видов (с эмиссией церкарий). При этом равновесие в подобных паразитарных системах может сохраняться относительно продолжительное время.

Гораздо реже в природе встречается тройное заражение моллюсков. И совсем редко тройная инвазия представлена зрелыми инфрапопуляциями партенит. Обычно происходит либо подавление одного из видов трематод, либо погибает моллюск-хозяин (Атаев, Добровольский, 1992; Combes, 1995). Поэтому очень неожиданной стала находка моллюска *Succinea putris*, зараженного зрелыми спороцистами трематод трех видов *Leucochloridium*.

Возможность этого явления заключается в особом типе внутримоллюскового развития спороцист *Leucochloridium*. В отличие от трематод, формирующих в моллюсках инфрапопуляции из сотен редий или спороцист, здесь одна спороциста может обеспечить реализацию жизненного цикла. Соответственно регулирование ее роста и интенсивности размножения происходит не на популяционном, а организменном уровне.

Заражение моллюсков трематодами *Leucochloridium* происходит пассивно – в процессе поедания яиц этих червей. При этом в сукцинее может развиваться множественная инвазия спороцистами одного, двух или нескольких видов *Leucochloridium*. Одна спороциста *L. paradoxum* может иметь не более 4 – 5 зрелых отростков (Wesenberg-Lund, 1931; Pojmanska, 1962; Гинецинская, 1964, 1968; Атаев, Токмакова, 2015). Соответственно, 19 зеленых отростков, обнаруженных нами в одной улитке, могут принадлежать 4 или 5 спороцистам этого вида.

В тройном заражении улитки спороцисты *L. paradoxum* и *L. perturbatum* и *L. vogtianum* суммарно имели семь зрелых отростков (включая один вышедший из моллюска). Это не намного больше, чем может иметь одна спороциста *L. paradoxum*. Поэтому при тройной инвазии нагрузка на организм моллюска-хозяина оставалась примерно на уровне одиночной инвазии.

Кроме того, зрелые отростки для реализации жизненного цикла не обязательно должны быть склеваны птицами, как это утверждается в большинстве работ. Они могут самостоятельно покидать хозяина через разрывы в его покровах (Woodhead, 1935; Rietschell, 1972; Атаев, Токмакова, 2015). При

этом отростки продолжают пульсировать до часа во внешней среде, имитируя личинок насекомых (нам приходилось наблюдать склевывание таких отростков птицами). Следовательно, имеется механизм, препятствующий перезаражению хозяина, заключающийся в удалении из моллюска избыточного количества зрелых отростков.

ВЫВОДЫ

1. Представленное в работе явление множественного заражения моллюска *Succinea putris* одновременно тремя видами трематод рода *Leucochloridium*: *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* демонстрирует способность спороцист прободать стенку тела моллюска и выходить во внешнюю среду, что является уникальным механизмом, препятствующим гиперинвазии моллюска-хозяина.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей кластера рДНК спороцист *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, как и экспресс-анализ методом RAPD, подтвердил возможность идентификации видов трематод рода *Leucochloridium* на основе таких морфологических признаков, как форма и характер окраски отростков спороцист.

3. Полученная с помощью оригинальных специфических праймеров последовательность нуклеотидов кластера генов рРНК (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* является на данный момент наиболее полной из представленных в GenBank для трематод рода *Leucochloridium*. (JN639012, JN639011, KU351661 и KP938186, KP938187).

4. Филогенетический анализ с использованием нескольких ядерных маркеров (консервативных участков, кодирующих 18S, 28S рРНК; транскрибируемых участков, кодирующих ITS1, ITS2) позволил выявить отношения видов трематод *Leucochloridium* внутри рода, а также определить систематическое положение семейства Leucochloridiidae. Полученные дендрограммы подтверждают классические филогенетические схемы, основанные на морфологических признаках.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕКСТЕ

к/к – конечная концентрация;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

п.н. – пар нуклеотидов;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр;

сох – cyclooxygenase (циклооксигеназа);

ND1 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1) – субъединица 1 никотинамидадениндинуклеотид дегидрогеназы;

CO1 (cytochrome C-oxidase subunit 1) – субъединица 1 цитохром С-оксидазы;

ITS (internal transcribed spacers) – внутренний транскрибируемый спейсер;

ETS (external transcribed spacers) – внешний транскрибируемый спейсер;

IGS (intergenic spacer) – межгенный спейсер;

NTS (nontranscribed spacer) – нетранскрибируемый спейсер;

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер;

RAPD-анализ (random amplified polymorphic DNA) – анализ полиморфизма фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью случайных праймеров;

AFLP-анализ (amplified fragment length polymorphism) – анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов;

ISSR (inter-simple-sequence-repeats) – внутренние простые повторы в последовательностях генома;

IRAP-анализ (inter-retransposon amplified polymorphism) – анализ внутреннего полиморфизма ретранспозонов;

RFLP-анализ (restriction fragment length polymorphism) – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов;

ML (maximum likelihood) – метод максимального правдоподобия;

BI (Bayesian inference) – метод Байеса;

ME (minimal evolution) – метод минимальной эволюции;

MP (maximum parsimony) – метод максимальной экономии;

NJ (neighbor-joining method) – метод ближайшего соседа;

SSU (small subunit) – малая субъединица рибосомы;

LSU (large subunit) – большая субъединица рибосомы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон, Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы / Н. И. Абрамсон // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 307 - 331.
2. Атаев, Г. Л. Развитие микрогемипопуляций редий *Philophthalmus rhionica* в моллюсках, природно-зараженных другими видами трематод / Г. Л. Атаев, А. А. Добровольский // Паразитология. – СПб, 1992. – Т. 23, № 3. – С. 227 - 233.
3. Атаев, Г. Л. Размножение партенит трематод *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiidae) / Г. Л. Атаев, А. А. Добровольский, А. С. Токмакова // Паразитология. – СПб, 2013. – Т. 47, № 2. – С. 178 - 182.
4. Атаев, Г. Л. Сезонные изменения в биологии *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiomorphae) / Г. Л. Атаев, А. С. Токмакова // Паразитология. – СПб, 2015. – Т. 49, № 3. – С. 200 - 207.
5. Банникова, А. А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А. А. Банникова // Журнал общей биологии. – Москва, 2004. – Т. 65, № 4. – С. 278 - 305.
6. Баршене, Я. Кариотипы трематод / Я. Баршене. – Вильнюс.: Academia, 1993. – С. 321 - 325.
7. Беэр, С. А. Церкариозы в урбанизированных экосистемах / С. А. Беэр, М. В. Воронин. – Москва: Наука, 2007 – С. 33.
8. Быховская-Павловская, И. Е. Изменчивость морфологических признаков и ее значение в систематике рода *Leucochloridium* Carus, 1835 / И. Е. Быховская-Павловская // Паразитологический сборник: сб. ст. / Издательство АН СССР. – М., Л., 1951. – Т.13. – С. 45 - 74.
9. Быховская-Павловская, И. Е. Новый вид сосальщика *Leucochloridium phragmitophila* sp. nov. из воробьиных птиц. – Доклад АН СССР, 1951. – 76(1). – С. 161 - 162.

10. Галактионов, К. В. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский. – СПб: Наука, 1998. – С. 401.
11. Генотипирование трематод рода *Leucochloridium*, обитающих на территории Ленинградской области / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко и др. // Паразитология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 414 - 419.
12. Гинецинская, Т. А. Значение окраски спороцист трематод рода *Leucochloridium* для диагностики вида. – Доклады АН СССР, 1953. – 88 (1). – С. 177 - 179.
13. Гинецинская, Т. А. Тремато́ды, их жизненные циклы, биология и эволюция / Т. А. Гинецинская. – Л.: Наука, 1968. – С. 411.
14. Догель, В. А. Курс общей паразитологии / В. А. Догель. – Л.: УчПедГиз, 1947. – С. 188 - 201.
15. Кириллов, А. А. Тремато́ды наземных позвоночных Среднего Поволжья / А. А. Кириллов, Н. Ю. Кириллова, И. В. Чихляев. – Тольятти: Кассандра, 2012. – 329 с.: ил.
16. Корнакова, Е. Е. Церкмероморфная гипотеза и современное положение в филогенетике паразитических плоских червей (к 100-летию со дня рождения академика Б. Е. Быховского) / Е. Е. Корнакова, О. Н. Пугачев // Труды Зоологического института РАН: сб. ст. / РАН. – СПб, 2009. – Т. 313, № 3. – С. 231 - 240.
17. Король, Э. Н. Обнаружение личинок трематод рода *Leucochloridium Carus*, 1835 в Украине / Э. Н. Король // Еколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: сб. ст. / Житомир. – Волинь, 2004. – С. 85 - 88.
18. Рыжик, М. С. Генотипирование зараженных трематодами и незараженных моллюсков *Planorbarius corneus* / М. С. Рыжик // Магистерская диссертация. – СПб, 2009.
19. Лукашов, В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В. В. Лукашов. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – С. 256.

20. Лухтанов, В. А. Принципы реконструкции филогенезов: признаки, модели эволюции и методы филогенетического анализа / В. А. Лухтанов // Труды Зоологического института РАН: сб. ст. / РАН. – СПб, 2013. – Приложение №2. – С. 39 - 52.
21. Начева, Л. В. Сравнительная гистология спороцист *Leucochloridium paradoxum* и *L. problematicum* (Trematoda: Leucochlorididae). Паразиты – компоненты водных и наземных биоценозов Казахстана / Л. В. Начева, Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская. – Алма-Ата: Наука, 1981. – С. 147 - 155.
22. Начева, Л. В. Гистологические исследования взаимоотношений в системе паразит-хозяин на примере спороцист трематод рода *Leucochloridium* (Carus, 1835) / Л. В. Начева, Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская // Тезисы докладов II Всесоюзного съезда паразитоценологов: сб. ст. / Наукова думка. – Киев, 1983. – С. 203.
23. Николаев, С. И. Родственные отношения десмоторацидных солнечников и гимнофриидных амёб на основании сравнения последовательностей генов 18S рРНК / С. И. Николаев, С. Верней, Ж. Фарни, А. П. Мыльников, Н. Б. Петров, Я. Павловский // ДАН, 2003, – Т. 393, № 4. – С. 1 - 4.
24. Павлинов, И. Я. К проблеме аксиоматического обоснования эволюционной кладистики / И. Я. Павлинов // Журнал общей биологии. – СПб, 1998. – № 59, вып. 6. – С. 586 - 605.
25. Пирс, Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная / Э. Пирс. - М.: Иностранная литература, 1962. – С. 962.
26. Прохорова, Е. Е. Использование RAPD-анализа для изучения генетической популяционной изменчивости моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев. – Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. – СПб, 2014. – № 168. – С. 62 - 68.
27. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – С. 162 - 166.

28. Скрябин, К. И. Трематоды животных и человека / К. И. Скрябин. – М., Л.: Наука, 1948. – Т.2. – С. 257 - 292.
29. Соболева, Т. Н. Личинки трематод рода *Leucochloridium* Carus, 1835 в Казахстане / Т. Н. Соболева, Л. Л. Осиповская // Известия АН КазССР. – Алмата, 1979. – Т. 1. – С. 26 - 34.
30. Трематода *Skrjabinolecithum spasskii* Belous, 1954 (Digenea: Naploporidae) – паразит кефалей (Mugilidae) из залива Петра Великого Японского моря и из вьетнамских вод Тонкинского залива: морфология и молекулярные данные / В. В. Беспрозванных, Д. М. Атопкин, Х. З. Нго и др. // Биология моря. – Владивосток, 2015. – Т. 41, № 4. – С. 256 - 263.
31. Япринцева, М. Л. Обнаружение спороцист *Leucochloridium paradoxum* Carus в Тернопольском Приднестровье / М. Л. Япринцева // Материалы X конференции Украинского Общества паразитологии: сб. ст. / Украинское Общество паразитологии. – Киев: Наукова думка, 1986. – Ч. 2. – С. 390.
32. Abbasi, M. Constant magnetic field of 50 mT does not affect weight gain and blood glucose level in BALB / M. Abbasi, M. Nakhjavani, S.Hamidi, M. Tarafdarnia and A. Esteghamati // ed. Sci. Monit. – 2007. – V. 13. – P. 151 - 154.
33. Abdel-Hamid, A. H. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs) / A. H. Abdel-Hamid, J. B. Molfetta, V. Fernandez, V. Rodrigues // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 1999. – V. 41, N. 5. – P. 291 - 295.
34. Ahrens, A. Abhandlung uber Wurmer, welche in einer Erdschnecke entdeckt worden sind / A. Ahrens // Mag. Ges. Naturf. Fr. Berlin. – 1810. – V. 4. – P. 292 - 295.
35. Altschul, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25, N. 17. – P. 338 - 402. Review.

36. Ataev, G. L., Babich, P. S., Tokmakova, A. S. The study of the sporocyst broodsacs coloring in *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Brachylaemidae) / G. L. Ataev, P. S. Babich, A. S. Tokmakova // Parazitologiya. – 2013. – V. 47, N. 5. – P. 372 - 379.
37. Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics / J. C. Avise, J. Arnold, R. Ball et al. // Annu. Rev. Ecol. Syst. – 1987. – V. 18. – P. 489 - 522.
38. Bakke, T.A. Studies of the helminth fauna of Norway. XXII. The common gull, *Larus canus* L., as final host for Digenea (Platyhelminthes). I. The ecology of the common gull and the infestation in relation to season and the gulls' habitat, together with the distribution of the parasites in the intestine / T. A. Bakke // Norwegian Journal of Zoology. – 1972a. – V. 20. – P. 165 - 188.
39. Bakke, T. A. Studies of the helminth fauna of Norway. XXIII. The common gull, *Larus canus* L., as final host for Digenea (Platyhelminthes). II. The relationship between infection and sex, age and weight of the common gull / T. A. Bakke // Norwegian Journal of Zoology. – 1972b. – V. 20. – P. 189 - 204.
40. Bakke, T. A. Functional morphology and surface topography of *Leucochloridium* sp. (Digenea), revealed by scanning electron microscopy / T. A. Bakke // Z. f. Parasitenkunde. – 1976a. – V. 51. – P. 115 - 128.
41. Bakke, T. A. Shape, size and surface topography of genital organs of *Leucochloridium* sp. (Digenea), revealed by light and scanning electron microscopy / T. A. Bakke // Z. Parasitenk. – 1976b. – V. 51. – P. 99 - 113.
42. Bakke, T. A. Intraspecific variation of adult *Leucochloridium* sp. (Digenea) from natural and experimental infections / T. A. Bakke // Can. J. Zool. – 1978. – V. 56. – P. 94 - 102.
43. Bakke, T. A. A revision of the family Leucochloridiidae Poche (Digenea) and studies on the morphology of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 / T. A. Bakke // Systematic Parasitology. – 1980. – V. 1. – P. 189 - 202.

44. Bakke, T. A. The morphology and taxonomy of *Leucochloridium* (L.) *variae* McIntosh (Digenea, Leucochloridiidae) from the Nearctic as revealed by light and scanning electron microscopy / T. A. Bakke // *Zoologica Scripta*. – 1982. – V. 11. – P. 87 - 100.
45. Barber, P. H. A marine Wallace's line / P. H. Barber, S. R. Palumbi, M. V. Erdmann, M. K. Moosa // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 692 - 693.
46. Baudon, A. Troisième supplément à la monographie des Succinées françaises. / Baudon, A. // *Journal de Conchyliologie*. – 1881. – V. 29. – P. 139 - 154.
47. Baverstock, P. R., Conflicting phylogenetic hypotheses for the parasitic platyhelminths tested by partial sequencing of 18S ribosomal RNA / P. R. Baverstock, A. M. Robyn Fielke, R. A. Bray, I. Beveridge // *International Journal for Parasitology*. – 1991. – V. 21, N. 3. – P. 329 - 339.
48. Benson, D. A. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36 (Database issue), D. 25 – 30 / D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, D. L. Wheeler // [Http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/36/suppl_1/D25](http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/36/suppl_1/D25) [accessed 11 July 2008].
49. Bowles, J. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum* / J. Bowles, M. Hope, W. U. Tiu, X. S. Liu, D. P. McManus // *Acta Tropica*. – 1993. – V. 55. – P. 217 - 229.
50. Berriman, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni* // *Nature* 460. – 2009. – P. 352 - 358.
51. Brant, S. V. Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America / S. V. Brant, E. S. Loker // *Parasitology*. – 2009. – V. 95, N. 4. – P. 941 - 963.
52. Brooks, F. G. Studies on the germ-cell cycle of Trematodes / F. G. Brooks // *Amer. J. Hyg.* – 1930. – V. 12. – P. 299 - 340.
53. Brooks, T. M. The induction of mitotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain JD1 / T. M. Brooks, L. P. Gonzalez, R. Calvert, J. M. Parry // *Prog. Mutat. Res.* – 1985. – V. 5. – P. 225 - 228.

54. Buntjer, J. B. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting / J. B. Buntjer, M. Otsen, I. J. Nijman, M. T. Kuiper, J. A. Lenstra // *Heredity*. – 2002. – V. 88, N. 1. – P. 46 - 51.
55. Carus, C. Beobachtungen über einen merkwürdigen Schöngefärbten Eingeweidewurm *Leucochloridium paradoxum* mihi und dessen parasitische Erzeugung in einer Landschnecke *Succinea amphibia* Drap., *Helix putris* / C. Carus // *Z. Nova Acta Leop. - Carol.* – 1835. – V. 17, N. 1. – P. 85 - 100.
56. Casey, S. P. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloriidae) / S. P. Casey, T. A. Bakke, P. D. Harris, J. Cable // *Systematic Parasitology*. – 2003. – V. 56. – P. 163 - 168.
57. Cable, R. M. Phylogeny and taxonomy of trematodes with reference to marine species. In *Symbiosis in the Sea* / R. M. Cable // Columbia, South Carolina. – 1974. – P. 173 - 193.
58. Cable, J. Phylogenetic analysis of *Gyrodactylus* spp. (Platyhelminthes: Monogenea) using ribosomal DNA sequences / J. Cable, P. D. Harris, R. C. Tinsley, C.M. Lazarus // *Canadian Journal of Zoology*. – 1999. – V. 77. – P. 1439 - 1449.
59. Carvalho, S. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) / S. Carvalho, R. L. Caldeira, A. J. Simpson, T. H. Vidigal // *Parasitology*. – 2001. – P. 197 - 209.
60. Coleman, A. W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure / A. W. Coleman // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – V. 35, N. 10.
61. Combes, C. *Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme* / C. Combes // Éditions Masson, Paris. – 1995. – P. 525 - 385.
62. Coustau, C. *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line / C. Coustau, G. Ataev, J. Jourdane, T. P. Yoshino // *Experimental Parasitology*. – 1997. – V. 87, I. 2 – P. 77 - 87.

63. Chikuni, K. Molecular phylogeny based on the kappa-casein and cytochrome b sequences in the mammalian suborder Ruminantia / K. Chikuni, Y. Mori, T. Tabata, M. Saito, M. Monma, M. Kosugiyama // *Experimental Parasitology*. – 1995. – V. 41, N. 6. – P. 859 - 66.
64. David, B. Gene diversity and genetic variation in lung flukes (genus *Paragonimus*) / B. David, N. Yukifumi, M. Makedonka, N. D. Pham // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 2016. – P. 6 - 12.
65. Dobrovolskij, A. The nature of reproduction of Trematodes Rediae and Sporocysts. *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites* / A. Dobrovolskij, G. Ataev // *Presses Universitaires de Perpignan*. – 2001. – V. 1. – P. 249 - 272.
66. Dvorak, J. Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences / J. Dvorak, S. Vanacova, V. Hampl, J. Flegr, P. Horak, // *Parasitology*. – 2002. – V. 124. – P. 307 - 313.
67. Ehlers, U. Comments on a phylogenetic system of Platyhelminthes / U. Ehlers // *Hydrobiologia*. – 1986. – V. 132. – P. 1 - 12.
68. Ehlers, U. *Das phylogenetische System der Platyhelminthes* / U. Ehlers // G. Fisher, Stuttgart – New York. – 1985. – P. 317.
69. Felsenstein, F. 1985. *Phylogenies and the Comparative Method* / F. Felsenstein // *The American Naturalist*. – 1985. – V. 125, N. 1. – P. 1 - 15.
70. Felsenstein, J. *Inferring phylogenies* / J. Felsenstein // Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. – 2004. – P. 664.
71. Forterre P. *Evolution of the Archaea* / C. Forterre, H. Brochier, H. Philippe // *Theor Popul Biol.* – 2002. – V. 61, N. 4. – P. 409 - 22. Review.
72. Forterre, P. *Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins* / P. Forterre, O. Matte-Tailliez, C. Brochier, H. Philippe // *Mol Biol. Evol.* – 2002. – V. 19, N. 5. – P. 631 - 639.
73. Fried, B. Lipids in the broodsac of *Leucochloridium variae* (Digenea, Leucochloridiidae) and its snail host *Succinea ovalis* / B. Fried, K. Beers, P.

- Lewis // International Journal for Parasitology. – 1993. – V. 23, N. 1 – P. 129 - 131.
74. Fried, B. Thin-Layer chromatographic and histochemical analyses of neutral lipids in the intramolluscan stages of *Leucochloridium variae* (Digenea, Leucochloridiidae) and the snail host, *Succinea ovalis* / B. Fried, P. Lewis, K. Beers // The Journal of Parasitology. – 1995. – V. 81, N. 1. – P. 112 - 114.
 75. Fried, B. Thin-Layer chromatographic and histochemical analyses of neutral lipids in the intramolluscan stages of *Leucochloridium variae* (Digenea, Leucochloridiidae) and the snail host, *Succinea ovalis* / B. Fried, P. Lewis, K. Beers // The Journal of Parasitology. – 2001. – V. 81, N. 1. – P. 112 - 114.
 76. Fried, B. Studies on collar spines of echinostomatid Trematodes / B. Fried, I. Kanev, A. Reddy // Parasitology Research. – 2009. – V. 105, I. 3. – P. 605 - 608.
 77. Fried, B. The biology of Echinostomes. From the Molecule to the Community / B. Fried, R. Toledo // USA: Springer Science, Business Media, LLC. – 2009. – P. 333.
 78. Gatesy, J. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences / J. Gatesy, C. Hayashi, D. Motriuk, J. Woods, R. Lewis // Science. – 2001. – V. 291. – P. 5.
 79. Gerbi, S. A. Evolution of eukaryotic rRNA: constraints imposed by RNA interactions / S. A. Gerbi, C. Jeppesen, B. Stebbins-Boaz, M. Jr. Ares // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 1987. – V. 52. – P. 709 - 19.
 80. Gibson, D. I. Keys to the Trematoda / D. I. Gibson, A. Jones, R. A. Bray // Wallingford: CAB International, Wallingford. – 2002. – P. 521.
 81. Grosberg, R.K. Characterization of genetic structure and genealogies using J.-P. Feral / R. K. Grosberg, D. R. Levitan, B. B. Cameron // Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols. Wiley-Liss, New York. – 1996. – P. 67 - 100.
 82. Hackman, W. Bärnstensnäckans egendomliga parasier av släktet *Leucochloridium* (Trematoda: Digenea), livscykel och förekomst i Finland /

- Hackman, W., Valovirta, I. // Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica. – 1995. – V. 72. – P. 13 - 16.
83. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucleic Acids Symposium Series. – 1999. – V.41. – P. 95 - 98.
84. Halik, L. Über die rhythmischen bewegungen der in Bernsteinschnecken parasitierenden sporozystenschlauche von *Leucochloridium macrostomum* Rud. (= *L. paradoxum* Carus) / L. Halik // Zeitschrift für vergleichende Physiology. – 1931. – V. 14. – P. 462 - 478.
85. Hamburger, J. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency / J. Hamburger, He-na, X.Y. Xin, et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1998. – V. 59. – P. 872 - 876.
86. Hamburger, J. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water / J. Hamburger, X. Yu-Xin, R. M. Ramzy, J. Jourdane, A. Ruppel // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1998. – V. 59. – P. 468 - 473.
87. Hamburger, J. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water / J. Hamburger, He-Na, I. Abbasi, R. M. Ramzy, J. Jourdane, A. Ruppel // Am J Trop Med Hyg. – 2001. – V. 65. – P. 907 - 911.
88. Heneberg, P. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida) / P. Heneberg, J. Sitko, J. Bizon // Parasitology. – 2016. – V. 143, N. 4 – P. 455 - 474.
89. Hanelt, B. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR / B. Hanelt, C. M. Adema, M. H. Mansour and E. S. Loker // J. Parasitol. – 1997. – V. 83. – P. 387 - 394.

90. Hertel, O. Assessment of the atmospheric nitrogen and sulphur inputs into the North Sea using a Lagrangian model / O. Hertel, C. A. Skjøth, L. M. Frohn, E. Vignati, J. Frydendall, G. Leeuw, U. Schwarz, S. Reis // *Phys. Chem. Earth* . – 2002. – V. 27. – P. 1507 - 1515.
91. Hertel, J. Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR / J. Hertel, K. Kedves, A. H. M. Hassan, B. Haberel, W. Has. // *Acta Tropica*. – 2004. – V. 91. – P. 43 - 46.
92. Hillis, D. J. Initial qualitative evaluation of computed radiography in an intensive care unit. // *Australas Radiol*. – 1996. – V. 40, N. 3. – P. 291 - 297.
93. Hillis, D. J. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference / D. J. Hillis, M. T. Dixon // *Q Rev Biol*. – 1991. – V. 66, N. 4. – P. 411 - 53. Review.
94. Iwagami, M. Molecular phylogeographic studies on *Paragonimus westermani* in Asia / M. Iwagami, L. Y. Ho, K. Su, P. F. Lai, M. Fukushima, M. Nakano, D. Blair, K. Kawashima, T. Agatsuma // *Journal of Helminthology*. – 2000. – V. 74. – P. 315 - 322.
95. Jannotti-Passos, L.K. Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) / L. K. Jannotti-Passos, K. G. Magalhães, O. S. Carvalho, T. H. D. A. Vidigal // *Journal of Parasitology*. – 2006. – V. 92, N. 2. – P. 401 - 403.
96. Jousson, O. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opecoelidae) parasitic in marine fishes / O. Jousson, P. Bartoli // *International Journal for Parasitology*. – 2001. – V. 31. – P. 706 - 714.
97. Jones, C. S. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling / C. S. Jones, A. E. Lockyer, D. Rollinson, L. R. Noble // *Parasitology*. – 2001. – V. 123. – P. 181 - 196.

98. Jukes, T. H. Evolution of Protein Molecules / T. H. Jukes, C.R. Cantor // Academic Press, New York. – 1969. – P. 21 - 132.
99. Kagan, I. Aspects in the life history of *Neoleucochloridium problematicum* (Magath, 1920) New Comb. And *Leucochloridium cyanocittae* McIntosh, 1932 (Trematoda: Brachylaemidae) / I. Kagan // Transcriptions of the American Microscopical Society. – 1951. – V. 70, N. 4. – P. 281 - 318.
100. Kagan, I. Revision of the subfamily *Leucochloridiinae* Poche, 1907 (Trematoda, Brachylaemidae) / I. Kagan // Amer. Madland. Naturalist. – 1952. – V. 48. – P. 257 - 301.
101. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // Journal of Molecular Evolution. – 1980. –V. 16. – P. 111 - 120.
102. Korsunenکو, A. Characterization of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments revealing clonal variability in cercariae of avian schistosome *Trichobilharzia szidati* (Trematoda: Schistosomatidae) / A. Korsunenکو, G. Chrisanfova, A. Arifov, A. Ryskov, S. Semyenova // OJGen. – 2010. – V.3, No.3. – P. 141 - 158.
103. Kostadinova, A. K. Phylogenetic relationships of *Echinostoma Rudolphi*, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via dna and morphological analyses / A. K. Kostadinova, E. A. Herniou, J. Barrett, D. T. J. Littlewood // Systematic Parasitology. – 2003. – V. 54. – P. 159 - 176.
104. Kostadinova, A. The Systematics of the Trematoda / A. Kostadinova, A. Pérez-del-Olmo // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2014. – V. 766. – P. 21 - 44.
105. Kumar, S. MEGA3: Integrated software for molecular genetics analysis and sequence alignment / S. Kumar, S. Tamura, M. Nei // Brief Bioinform. – 2004. – V.5. – P. 150 - 163.
106. Lapierre, A. R. Molecular phylogeny of the trematode families Diplostomidae and Strigeidae / A. R. Lapierre // Presented in Partial Fulfillment of the

- Requirement for the Degree of Master of Science (Biology) at Concordia University. - Montreal, Quebec, Canada. – 2011.
107. Leles, D. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis / D. Leles, P. Cascardo, A. Freire, Jr. A. Maldonado, L. Sianto, A. Araújo // *Parasitology International*. – 2014. – V. 63. – P. 646 - 649.
 108. Lewis, W. Helminths of terrestrial molluscs in Nebraska. II. Life cycle of *Leucochloridium varia* McIntosh, 1932 (Digenea: Leucochloridae) / W. Lewis, P. D. Jr // *Journal of Parasitology*. – 1974. – V. 60. – P. 251 - 255.
 109. Lewis, W. Adaptations for the transmission of species of *Leucochloridium* from molluscan to avian hosts / W. Lewis, P. D. Jr // *Proceedings of the Montana Academy of Sciences*. – 1977. – V. 37. – P. 70 - 81.
 110. Lewis, F. A. A laboratory-based approach to biological control of snails / F. A. Lewis, M. Knight, C. S. Richards // *Biomedical Research Institute, Rockville, MD 20852, USA*. – 1997.
 111. Littlewood, D. T. J. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules / D. T. J. Littlewood, K. Rohde, K. A. Clough // *Biological Journal of the Linnean Society* – 1999. – V. 66. – P. 75 - 114.
 112. Magath, T. B. *Leucochloridium problematicum* n. sp. / T. B. Magath // *The Journal of Parasitology*. – 1920. – V. 6, N. 3. – P. 105 - 114.
 113. McGinnis, S. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools / S. McGinnis, T. L. Madden // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – P. 20 - 25.
 114. McIntosh, A. Notes on the genus *Leucochloridium* Carus (Trematoda) / A. McIntosh // *Parasitology*. – 1927. – V. 19. – P. 353 - 364.
 115. Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual* / T. Maniatis, J. Sambrook, E. F. Fritsch // 2-nd ed. 1-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – P. 1659.

116. Menz, M. A. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers / M. A. Menz, R. R. Klein, J. E. Mullet, J. A. Obert, N. C. Unruh, P. E. Klein // *Plant Mol Biol.* – 2002. – V. 48, N. 5. – P. 483.
117. Michot, B. Conserved secondary structures in the ITS2 of trematode pre-rRNA / B. Michot, L. Despres, F. Bonhomme, J. P. Bachellerie // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 316, N. 3. – P. 247 - 252.
118. Moss, T. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I / T. Moss, V.Y. Stefanovsky // *Cancer Research Centre, Laval University, Hôtel-Dieu de Québec, Canada.* – 1995.
119. Mönnig, H. O. Über *Leucochloridium macrostomum* (*Leucochloridium paradoxum* Carus), ein Beitrag Zur Histologie der Trematoden / H. O. Mönnig // *Jena: Gustav Fischer.* – 1922.
120. Mohan, M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants / M. Mohan, S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C. R. Bhatia, T. Sasaki // *Molecular Breeding.* – 1997. – V. 3, N. 2. – P. 87 - 103.
121. Morgan, J. A. Trematode and monogenean rRNA ITS2 secondary structures support a four-domain model / J. A. Morgan, D. Blair // *J. Mol. Evol.* – 1998. – V. 47, N 4. – P. 406 - 419.
122. Nadakal, A. M. Types and sources of pigments in certain species of larval Trematodes / A. M. Nadakal // *The Journal of Parasitology.* – 1960. – V. 46, N. 6. – P. 777 - 786.
123. Nara, P. Evidence for rapid selection and deletion of HIV-1 subpopulations in vivo by V3-specific neutralizing antibody: a model of humoral-associated selection / P. Nara, L. Smit, N. Dunlop, W. Hatch, M. Merges, D. Waters, J. Kelliher, W. Krone, J. Goudsmit // *Dev Biol Stand.* – 1990. – V. 72. – P. 315 - 410.

124. Oliveira, A. L. Schistosome/mollusk: genetic compatibility / A. L. Oliveira, D. Da Silva, E. M. Zanotti-Magalhaes, A. Z. Abdel-Hamid // JT. Genet Mol Res. – 2008. – V. 7, N. 2. – P. 518 - 526.
125. Olson, P.D. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) / P. D. Olson, T. H. Cribb, V. V. Tkach, R. A. Bray, D. T. Littlewood // Parasitic Worms Division, Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK. – 2003.
126. Paran, J. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce / J. Paran, R.W. Michelmore // Theor. Appl. Genet. – 1993. – V. 85. – P. 985 - 993.
127. Pojmanska, T. On sporocysts of the genus *Leucochloridium* in Poland / T. Pojmanska // Acta Parasitologica Polonica. – 1962. – V. 10. – P. 369 - 376.
128. Pojmanska, T. Experimental development of *Leucochloridium* sp. (Trematoda, Brachylaemidae) / T. Pojmanska // Acta Parasitologica Polonica. – 1963. – V. 11. – P. 153 - 159.
129. Pojmanska, T. Variability of *Leucochloridium paradoxum* Carus (= *L. heckerti* Kagan, 1952) (Trematoda: Brachylaemidae) in natural and experimental conditions / T. Pojmanska // Acta Parasitologica Polonica. – 1967. – V. 14. – P. 381 - 398.
130. Pojmanska, T. *Leucochloridium perturbatum* sp. n. (Trematoda, Brachylaimidae), morphology, individual variability and life cycle / T. Pojmanska // Acta Parasitol. Polon. – 1969a. – V. 16, N. 20. – P. 153 - 175.
131. Pojmanska, T. Life cycle and morphology of the adult *Leucochloridium* sp. n. (Trematoda, Brachylaimidae) / T. Pojmanska // Acta Parasitol. Polon. – 1969b. – V. 16, N. 21. – P. 177 - 184.
132. Pojmanska, T. Life cycle of *Leucochloridium vogtianum* Baudon, 1881 (= *L. phragmitophila* Bykovskaja-Pavlovskaja et Dubinina, 1951 in parte) (Trematoda, Leucochloridae) / T. Pojmanska // Acta Parasitologica Polonica. – 1978. – V. 25. – P. 11 - 20.

133. Pojmanska, T. Differentiation of the ultrastructure of the body wall of the sporocyst of *Leucochloridium paradoxum* / T. Pojmanska, K. Machaj // International Journal for Parasitology. – 1991. – V. 21, N. 6. – P. 651 - 659.
134. Pontes, L. A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces / L. A. Pontes, E. Dias-Neto, A. Rabello // Am J Trop Med Hyg. – 2002. – V. 66, N. 2. – P. 157 - 162.
135. Posada, D. Modeltest: testing the model of DNA substitution / D. Posada, K. A. Crandall // Bioinformatic. – 1998. – V. 14. – P. 817 - 818.
136. Rayski, C. Investigation on some trematodes of birds the east Scotland / C. Rayski, M. A. Fahmy // Z. f. Parasitenkunde. – 1962. – V. 22. – P. 186 - 195.
137. Razo-Mendivil, U. A New Species of *Auriculostoma* (Digenea: Allocreadiidae) in the Mexican Tetra *Astyanax mexicanus* (Actinopterygii: Characidae) from Central Veracruz, Mexico, described with the use of morphological and molecular data / U. Razo-Mendivil, B. Mendoza-Garfias, G. Pérez-Ponce de León, M. Rubio-Godoy // Journal of Parasitology. – 2014. – V. 100, N. 3. – P. 331 - 337.
138. Robinson, E. J. Notes on the life history of *Leucochloridium fuscostriatum* n. sp. (Trematoda: Brachylaemidae) / E. J. Robinson // The Journal of Parasitology. – 1947. – V. 33, N. 6. – P. 467 - 475.
139. Ronquist, F. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models / F. Ronquist, J. P. Huelsenbeck // Bioinformatics. – 2003. – V. 19, N. 12. – P. 1572 - 1574.
140. Rozhkovan, K. V. Phylogenetic relationships of *Paradiclybothrium pacificum* and *Diclybothrium armatum* (Monogeneoidea: Diclybothriidae) inferred from 18S rDNA sequence data / K. V. Rozhkovan, M. B. Shedko // Parasitology International. – 2015. – V. 64, N. 5. – P. 448 - 452.
141. Rudolphi, C. A. Neue Beobachtungen uber die Eingeweidewurmer / C. A. Rudolphi // Arch. Zool. Zootomie. – 1803. – V. 3. – P. 1 - 32.

142. Rudolphi, C. A. Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi / C. A. Rudolphi // Augustus Riicker, Berolini. – 1819.
143. Rudolfova, J. Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland / J. Rudolfova, D. T. Littlewood, J. Sitko, P. Horak // Folia Parasitol (Praha) . – 2007. – V. 54, N. 2. – P. 88 - 93.
144. Rząd, I. *Leucochloridium paradoxum* isolate PLSzcz-2009 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence / I. Rząd, P. Hofsoe, R. Panicz, J. K. Nowakowski // <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JF346883.1>. – 2011.
145. Saijuntha, W. Genetic characterization and phylogenetic analysis of echinostomes / W. Saijuntha, C. Tantrawatpan, P. Sithithaworn, K. Duengai, T. Agatsuma, R. H. Andrews, T. N. Petney // Southeast Asian J Trop Med Public Health. – 2014. – V. 45, N. 5. – P. 1003 - 1010.
146. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. – 1989. – Tome 1 - 3.
147. Sambrook, J. Molecular cloning. Laboratory manual / J. Sambrook, I. F. Fritch, T. Maniatis // N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1991.
148. Scholz, T. *Auriculostoma astyanace* n. gen., n. sp. (Digenea: Allocreadiidae), from the banded astyanax, *Astyanax fasciatus* (Characiformes: Characidae), from Nicaragua, with a reevaluation of neotropical *Crepidostomum* spp. / T. Scholz, A. Aguirre-Macedo, D. Choudhury // The Journal of parasitology. – 2004. – V. 90, N. 5. – P. 1128 - 1132.
149. Schultz, J. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota / J. Schultz, S. Maisel, D. Gerlach, T. Müller, M. Wolf // RNA 11. – 2005. – P. 361 - 364.

150. Selig, C. The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics / C. Selig, M. Wolf, T. Müller, T. Dandekar and J. Schultz // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – V. 36. – P. 377 - 380.
151. Shekhovtsov, S. V. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchidae, Trematoda) / S. V. Shekhovtsov, A. V. Katokhin, K. V. Romanov et al. // *Parasitol. Res.* – 2009. – V. 106. – P. 293 - 297.
152. Shekhovtsov, S. V. 2010. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) / S. V. Shekhovtsov, A. V. Katokhin, N. A. Kolchanov, V. A. Mordvinov // *Parasitology International*. – 2010. – V. 59, N. 1. – P. 100 - 103.
153. Shulong, Z. A preliminary observation on the ultrastructure of mother and daughter sporocysts of *Schistosoma japonicum* / Z. Shulong, L. Jianyin, K. Chuhao // *Acta Zoologica Sinica*. – 1985. – V. 31. – P. 143 - 149
154. Shylla, J. Utility of divergent domains of 28S ribosomal RNA in species discrimination of paramphistomes (Trematoda: Digenea: Paramphistomoidea) / J. A. Shylla, S. Ghatani, V. Tandon // *Parasitol Res.* – 2013. – V. 112. – P. 4239 - 4253.
155. Simpson, A. J. Recent molecular approaches to the study of schistosome genetics / A. J. Simpson, E. Dias Neto, D. A. Johnston, A. Kaukas, D. Rollinson // *Experimental Parasitology*. – 1993. – V. 77, N. 3. – P. 376 - 379.
156. Spada, R. G. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection / R. G. Spada, D. Silva, A. Z. Abdel-Hamid, S. S. Sobral-Hamaguchi, N. R. Zuim, E. M. Zanotti-Magalhaes, L. A. Magalhaes, J. T. Ribeiro-Paes // *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97 Suppl. – 2002. – V. 1. – P. 53 - 8.
157. Springer, M. S. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction / M. S. Springer, R. W. Debry, C. Douady,

- H. M. Amrine, O. Madsen, W. W. De Jong, M. J. Stanhope // *Mol. Biol. Evol.* – 2001. – V. 18, N. 2. – P. 132 - 142.
158. Storch, V. Der Bau der Körperwand von *Leucochloridium paradoxum* / V. Storch, U. Welsch // *Z. f. Parasitenkunde.* – 1970. – V. 35. – P. 67 - 75.
159. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1993. – V.10, N. 5. – P. 12-526.
160. Tkach, V. Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea / V. V. Tkach, J. Pawlowski, J. Mariaux, Z. Swiderski // Littlewood, D. T. J., Bray, R. A. (Eds.); *Interrelationships of platyhelminthes.* – London, Taylor, Francis. – 2001. – P. 186-193.
161. Vidigal, T. H. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis / T. H. Vidigal, E. Dias Neto, O. S. Carvalho, A. J. Simpson // *Experimental Parasitology.* – 1994. – V. 79, N. 2. – P. 187 - 194.
162. Vos, P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper et al. // *Nucleic acids research.* – 1995. – V. 23, N. 21. – P. 4407 - 4414.
163. Wesenberg-Lund, C. Contribution to the development of the trematoda Digenea. Part I. The biology of *Leucochloridium paradoxum* / C. Wesenberg-Lund // *Konglige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling.* – 1931. – V. 9. – P. 94 - 142.
164. Welsh, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // *Nucleic acids research.* – 1990. – V. 18, N. 24. – P. 7213 - 7218.
165. Williams, J. G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey // *Nucleic acids research.* – 1990. – V. 18, N. 22. – P. 653 - 655.

166. Woodhead, E. The mother sporocysts of *Leucochloridium* / E. Woodhead // The Journal of Parasitology. – 1935. – V. 21, N. 5. – P. 337 - 346.
167. Woodhead, E. An extraordinary case of multiple infection with the sporocysts of *Leucochloridium* / E. Woodhead // The Journal of Parasitology. – 1936. – V. 22, N. 2. – P. 227 - 228.
168. Wolf, M. Homology modeling revealed more than 20.000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures / M. Wolf, M. Achtziger, J. Schultz, T. Dandekar, T. Muller // RNA 11. – 2005. – P. 327 - 336.
169. Zarlenga, D. S. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary Parasitology / D. S. Zarlenga, J. Higgins // Vet Parasitol. – 2001. – V. 101. – P. 215 - 230.
170. Zdarska, Z. Ultrastructure of the tegument and associated structures of *Leucochloridium paradoxum* sporocyst and metacercaria / Z. Zdarska, T. N. Soboleva, L. L. Ospovskaya // Folia parasitologica. Praha. – 1982. – V. 29. – P. 247 - 251.
171. Zeder, G. H. Erster nachtrag zur naturgeschichte der eingeweidewurmec / G. H. Zeder, J. A. Goeze // Lpz. – 1800.

Приложение

**Нуклеотидная последовательность рДНК *Leucochloridium paradoxum*,
включающая участок 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S**

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5      15      25      35      45
TGCGAATGGC TCATTAAATC AGCTATGGTT CCTTAGATCA TAAATACTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  55      65      75      85      95
ATGGATAACT GTAGTAATTC TAGAGCTAAT ACATGCCACT ATGCCCTGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 105     115     125     135     145
CCGCAAGGGA ATGGGTGGAT TTATTAGAAC AGAACCAACC AGAAATAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 155     165     175     185     195
TCGGCTATTT CTGTTGTA CTGTGATGAC TCTGGATAAC TTCACTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 205     215     225     235     245
GCAGTCGACC TTGTGTCGGC GACGGATCTT TCAAATATCT GCCCTATCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 255     265     275     285     295
CTGTTCGATGG TAGGTGACCT GCCTACCATG GTGATAACGG GTAACGGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 305     315     325     335     345
ATCAGGGTTC GATTCCGGAG AGGGAGCCTG AGAAACGGCT ACCACTTCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 355     365     375     385     395
AGGAAGGCAG CAGGCGCGAA AATTACCCAC TCCCGGCACG GGGAGGTAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 405     415     425     435     445
GACGAAAAAT ACGAATACGG GACTCAATTG AGGCTCCGTA ATTCGAATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 455     465     475     485     495
GTACACTTTA AATCCTTTAA CGAGGACCAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 505     515     525     535     545
CAGCAGCCGC GGTAAC TCCA GCTCCAAAAG CGTATATTAA AGTTGCTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 555     565     575     585     595
GTTAAAAAGC TCGTAGTTGG ATCTGGGTCG TGTGGTCACA TACCGTTGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 605     615     625     635     645
TGTTCTAC TA TCTTGATTAA AATCGAGACA GTAGTACGGG TCGGTGTAGT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  655      665      675      685      695
GACCGTGCAA CCTTTCAGTC GTGTCTGTGT AAACAGGTGT TGGTTTAGTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  705      715      725      735      745
AATAGGTTTCG CCCTATTAGC TTGCTAACAT GCTTCCGGAT GCCTTTAAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  755      765      775      785      795
GGGTGTCGGG GGCAGACGAC ACTTTTACTT TGAACAAATT TGAGTGCTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  805      815      825      835      845
AAGCAGGCTT GTATGCCTGA AAATTCTTGC ATGGAATAAT AGAATAGGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  855      865      875      885      895
TTCGGTTCTA TTTTGTTGGT TCTCGGATCC GAAGTAATGG TTAAGAGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  905      915      925      935      945
CAGACGGGGG CATTTGTATG GCGGTGTTAG AGGTGAAATT CTTGGATCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  955      965      975      985      995
CGCCAGACAA ACTACAGCGA AAGCATTTGC CAAGAATGTT TTCATTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1005     1015     1025     1035     1045
AGGAGCGAAA GTCAGAGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CCTAGTTCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1055     1065     1075     1085     1095
ACCATAAACG ATGCCAACTG ACGATCCGCG GTGGTTCTTT AATTGGCTCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1105     1115     1125     1135     1145
GCGGGCAGTC CCCGGGAAAC CTTTAAGTCT TTGGGCTCCG GGGGAAGTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1155     1165     1175     1185     1195
GGTTGCAAAG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1205     1215     1225     1235     1245
TGGAGCCTGC GGCTTAATTC GACTCAACAC GGGAAAATC ACCCGGCCCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1255     1265     1275     1285     1295
GACTACTGTA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTTGAT TCGGTGGTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1305     1315     1325     1335     1345
GTGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG CGATTTGTCT GGTAAATTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1355     1365     1375     1385     1395
GATAACGAAC GAGACTTTGA CCTACTAAAT AGTTCGCCTG TCCTCTGTGC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1405      1415      1425      1435      1445
TCGTGCAGAT TGCGGCTTCT ACTGCCTCTT CGAGGGGTGA TAGGGTCGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1455      1465      1475      1485      1495
AATCGACGGG TACGGTGCAG GTGTAACTT CTTAGAGGGA CAAGCGGCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1505      1515      1525      1535      1545
ACAAGTCGCA CGAAATTGAG CAATAACAGG TCTGTGATGC CCTTAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1555      1565      1575      1585      1595
CCGGGGCCGC ACGTGCGCTA CAATGACGGT GTCAGCGAGT CTGAAAACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1605      1615      1625      1635      1645
GGCCCCAAAG GGTGGGTAA ACTGTTCCAT CACCGTCGTG ACTGGGATCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1655      1665      1675      1685      1695
GGGCTTGCAA TTATTCCCCG TGAACGAGGA ATTCTTGGTA AGTGCAAAGTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1705      1715      1725      1735      1745
ATAAGCTTGC GCTGATTACG TCCCTGCCCT TTGTACACAC CGCCCGTCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1755      1765      1775      1785      1795
TACTACCGAT TGAATGGTTT AGCAAGGTCC TCGGATTGGT GATGTTGTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1805      1815      1825      1835      1845
TGACTTTTGT CACATGAACT GTGCCAAGAA GACGACCGAA CTTGATCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1855      1865      1875      1885      1895
TAGAGGAAGT AAAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1905      1915      1925      1935      1945
GATCATTACA AATCCCTAAT TATTAAACCA TTATTATCAT ACATATGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1955      1965      1975      1985      1995
ATGTGTGCAT GTATGTATGT ATAAAAGTCT ACTTGATGTT TGGTATTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2005      2015      2025      2035      2045
AAGTAACTAA ACATTAAAAG ACTATAAATT TATATGTAAA CAATATTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2055      2065      2075      2085      2095
ATTTATTAAA AGAAATTGAC GGATGGATTT TATGGATCCG CGGCTTAGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2105      2115      2125      2135      2145
CTATGCCTAT CAATTTAAAT TTGTTATGCA TAGTGCCTGT GTTAGACGAG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2155      2165      2175      2185      2195
GTGTCTAACC TGTCAGATGC TCTG-TGTGT AAGTTCAGCG GGTAATCCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2205      2215      2225      2235      2245
CCAGATGTTG CTATCCTACT AATCTACCAG TCATGCTTAG AGCGACAGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2255      2265      2275      2285      2295
TAGTACTGTG TACAACACTG TGCTAGGCTC AAAGAGGAGT GCAGGACTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2305      2315      2325      2335      2345
GGACCGGCTC CCGCCTCATT TGTTGTTATT TTAATTACTA TTATTACACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2355      2365      2375      2385      2395
GTTTAAGCTA ACTAAATTAG ATTTAATTCT GATTTTGTTA GTTGAATAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2405      2415      2425      2435      2445
GGCATGCACC TGATTGCTAG TCAATTGGAC TGCATGTGAC GATCGCCTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2455      2465      2475      2485      2495
CGGTGCCTTA TCCTAGGCTC GATCGGTAAA TCGAAATGTT TGTTTTTATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2505      2515      2525      2535      2545
AATTTAATGA AACAAATATT GTACAACTTT AAGCGGTGGA TCACTCGGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2555      2565      2575      2585      2595
CGTGTGTCGA TGAAGAGTGC AGCCAACGTG GTGAATTAAT GTGAAC TGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2605      2615      2625      2635      2645
TACTGCTTTG AACATCGACC TCTTGAACGC ATATTGCGGC CACGGGATAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2655      2665      2675      2685      2695
CCTGTGGCCA CGCCTGGCCG AGGGTCGGCT TATAAACTAT CACGATGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2705      2715      2725      2735      2745
AAAAAGTCGT GGATTGGATG CTGTGCCAGC TGGCATGATT TCCTTAATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2755      2765      2775      2785      2795
AGTATTTAAT ATACATACAT ATGAGGTGCC AGATCTATGG CTCCGTCCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2805      2815      2825      2835      2845
ATGTATCCGG TTACAGCCAA GTCTATATTT ATTATAATAT TAAATGAAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2855      2865      2875      2885      2895
TGCTGTAATG GATTATGCTC AGGTCTGGC TCAATGATTT TGAACACGCT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2905      2915      2925      2935      2945
TGATGTTATA ATTTATATAT ATATAAATAT AGACATTGGA TTATTTTGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2955      2965      2975      2985      2995
GCCGAGGGAG TGTAATACT CTATAATTTG GGTAATTTAT TGATTTATAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3005      3015      3025      3035      3045
GATACCCTAA TTATATATAT TATGACCCTG ACCTCGGATC AGACGTGATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3055      3065      3075      3085      3095
ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCACTAAGCG GAGGAAAAGA AACTAACCAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3105      3115      3125      3135      3145
GATTCCCCCA GTAACGGCGA GTGAACGGGG ATTAGCCCAG CACCGAAGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3155      3165      3175      3185      3195
TGTGACCATT TGGTTACTAG GCAATGTGGT GTTTAGGTCA ACTTATGGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3205      3215      3225      3235      3245
TTATTGCTCT ACCCTAAGTC CAGCAATGAG TACGGCTTAC TGGAATGGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3255      3265      3275      3285      3295
CATAGAGGGT GAAAGGCCCG TAAGGGTAGA GACCAAATGG ACAATAATGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3305      3315      3325      3335      3345
CCTTAGTAGA CCTTGGAGTC GGGTTGTTTG TGAATGCAGC CCAAATGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3355      3365      3375      3385      3395
TGGTAAACTC CATCTAAGGC TAAATACTGA CACGAGTCCG ATAGCGAACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3405      3415      3425      3435      3445
AGTACCCTGA GGGAAAGTTG AAAAGTACTT TGAAGAGAGG GTAAACAGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3455      3465      3475      3485      3495
CGTGAAACCG CTTAAAGGTA AACGGGTGGA GTTGAACTGT AAGCCTTGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3505      3515      3525      3535      3545
AATTCAACTG GTAAGTATTA CATGAGCTTG GGCATTATTG GTCGACTTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3555      3565      3575      3585      3595
AAAGTCTGCT TAGTTGCGGG TCCTTGACCT TTATTGGTTA AGGATGTGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3605      3615      3625      3635      3645
ATGCACTATT AAAGTGCTGT GCACTTTAAA AGTTGAAGGC CTGCTTGCCA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3655      3665      3675      3685      3695
GTGCACTTTC CCTTGGTGAT CACCACGACC GCGGCTGCTG TCTGTTTACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3705      3715      3725      3735      3745
TTGATCAAAC CGATTTTGTC TAACCTTTAT GATTAGACCT AATCGGGATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3755      3765      3775      3785      3795
GCAGGTAGCT CATTGGTTAA TTGTTAGCTT TTGTTAACAA TTATCTTTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3805      3815      3825      3835      3845
GTGTAATCAG CTGATCATTG TAAATCTGTG CAGTGCGCCG GAGATGACGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3855      3865      3875      3885      3895
CTATGGTGTG TGCATACGTG CTTTGCTAAT TGATGTTGCT TAGTCTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3905      3915      3925      3935      3945
GGATTTGTTT ACTCACTTTT GTGGGTCTGC TGATGGCTAA GCTTCGTTTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3955      3965      3975      3985      3995
ATTATCGGTA GCGTATGTGA CACTAAATTG GGCCAATAGT CTGTGGTGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4005      4015      4025      4035      4045
GCGGTAGACG ATCCACCTGA CCCGTCTTGA AACACGGACC AAGGAGTTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4055      4065      4075      4085      4095
ACATGTGCGC GAGTCATTGG GCGTTACGAA ACCCAAAGGC GTAGTGAAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4105      4115      4125      4135      4145
TAAAGGCTTA GCTTGTCTAA GCTGTGGTGA GATCCTGCCG TTTCTCGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4155      4165      4175      4185      4195
CTGGTACCAC CAAGCGTTTG AGCGGTAGGC GCATCACCAG CCCGTCTCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4205      4215      4225      4235      4245
GGTGTAGTCA TGTAAC TTGT TATATGCATC ACCGGGGCGG AGCTTGAGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4255      4265      4275      4285      4295
TACACGTTGA GACCCGAAAG ATGGTGA ACT ATGCTTGCGC AGGTTGAAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4305      4315      4325      4335      4345
CAGAGGAAAC TCTGGTGGAG GACCGTAGCG ATTCTGACGT GCAAATCGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4355      4365      4375      4385      4395
CGTCTAACGT GAGTATAGGG GCGAAAGACT AATCGAACCA TCTAGTAGCT

```

.....|.....||.....||.....|
4405 4415 4425
GGTTCCTCC GAAGTTTCCC TCAGGATAGC

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 1837 – участок 18S.

1838 – 2521 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

2522 – 2681 – участок 5.8S.

2682 – 3039 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

3040 – 4444 – участок 28S.

**Нуклеотидная последовательность рДНК *Leucochloridium perturbatum*,
включающая участок 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S**

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5      15      25      35      45
TGCGAATGGC TCATTAAATC AGCTATGGTT CCTTAGATCA TAAATACTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  55      65      75      85      95
ATGGATAACT GTAGTAATTC TAGAGСТААТ АСАТGCCACT ATGCCCTGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 105     115     125     135     145
CCGCAAGGGA ATGGGTGGAT TTATTAGAAC AGAACCAACC AGAAATAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 155     165     175     185     195
TCGGCTATTT CTGTTGТАCT CTGTGATGAC TCTGGATAAC TTCACTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 205     215     225     235     245
GCAGTCGACC TTGTGTCGGC GACGGATCTT TCAAATATCT GCCCTATCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 255     265     275     285     295
CTGTTCGATGG TAGGTGACCT GCCTACCATG GTGATAACGG GTAACGGGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 305     315     325     335     345
ATCAGGGTTC GATTCCGGAG AGGGAGCCTG AGAAACGGCT ACCACTTCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 355     365     375     385     395
AGGAAGGCAG CAGGCGCGAA AATTACCCAC TCCCGGCACG GGGAGGTAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 405     415     425     435     445
GACGAAAAAT ACGAATACGG GACTCAATTG AGGCTCCGTA ATTCGAATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 455     465     475     485     495
GTACACTTTA AATCSTTTAA CGAGGACCAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 505     515     525     535     545
CAGCAGCCGC GGТААСТССА GCTCCAAAAG CGTATATTAA AGTTGCTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 555     565     575     585     595
GTTAAAAAGC TCGTAGTTGG ATCTGGGTCG TGTGGTCACA TACCGTTGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 605     615     625     635     645
TGTTCTACTA TCTTGATTAA AATCGAGACA GTAGTACGGG TCGGTGTAGT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  655      665      675      685      695
GACCGTGCAA CCTTTCAGTC GTGTCTGTGT AACAGGTGT TGGTTTAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  705      715      725      735      745
AATAGGTTTCG CCCTATTAGC TTGCTAACAT GCTTCCGGAT GCCTTTAAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  755      765      775      785      795
GGGTGTCGGG GGCAGACGAC ACTTTTACTT TGAACAAATT TGAGTGCTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  805      815      825      835      845
AAGCAGGCTT GTATGCCTGA AAATTCTTGC ATGGAATAAT AGAATAGGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  855      865      875      885      895
TTCGGTTCTA TTTTGTGGT TCTCGGATCC GAAGTAATGG TTAAGAGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  905      915      925      935      945
CAGACGGGGG CATTTGTATG GCGGTGTTAG AGGTGAAATT CTTGGATCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  955      965      975      985      995
CGCCAGACAA ACTACAGCGA AAGCATTTGC CAAGAATGTT TTCATTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1005     1015     1025     1035     1045
AGGAGCGAAA GTCAGAGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CCTAGTTCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1055     1065     1075     1085     1095
ACCATAAACG ATGCCAACTG ACGATCCGCG GTGGTTCTTT AATTGGCTCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1105     1115     1125     1135     1145
GCGGGCAGTC CCCGGGAAAC CTTTAAGTCT TTGGGCTCCG GGGGAAGTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1155     1165     1175     1185     1195
GGTTGCAAAG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1205     1215     1225     1235     1245
TGGAGCCTGC GGCTTAATTC GACTCAACAC GGGAAAATC ACCCGGCCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1255     1265     1275     1285     1295
GACACTGTGA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTTGAT TCGGTGGTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1305     1315     1325     1335     1345
GTGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG CGATTTGTCT GGTAAATTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1355     1365     1375     1385     1395
GATAACGAAC GAGACTTTGA CCTACTAAAT AGTTCGCTG TCCTCTGTGC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1405      1415      1425      1435      1445
TCGTGCAGAT TCGCGCTTCT ACTGCCTCTT CGAGGGGTGA TAGGGTCGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1455      1465      1475      1485      1495
AATCGACGGG TACGGTGCAG GTGTAACTT CTTAGAGGGA CAAGCGGCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1505      1515      1525      1535      1545
ACAAGTCGCA CGAAATTGAG CAATAACAGG TCTGTGATGC CCTTAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1555      1565      1575      1585      1595
CCGGGGCCGC ACGTGCCTA CAATGACGGT GTCAGCGAGT CTGGAAACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1605      1615      1625      1635      1645
GGCCCCGAAAG GGTGGGTAA ACTGTTCCAT CACCGTCGTG ACTGGGATCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1655      1665      1675      1685      1695
GGGCTTGCAA TTATTCCCCG TGAACGAGGA ATTCTTGGTA AGTGCAAGTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1705      1715      1725      1735      1745
ATAAGCTTGC GCTGATTACG TCCCTGCCCT TTGTACACAC CGCCCGTCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1755      1765      1775      1785      1795
TACTACCGAT TGAATGGTTT AGCAAGGTCC TCGGATTGGT GATGTTGTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1805      1815      1825      1835      1845
TGACTTTTGT CACATGAACT GTGCCAAGAA GACGACCGAA CTTGATCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1855      1865      1875      1885      1895
TAGAGGAAGT AAAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1905      1915      1925      1935      1945
GATCATTACA AATCCCTAAT TATTAAACCA TTATTATCAT ACATATGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1955      1965      1975      1985      1995
ATGTGTGCAT GTATGTATGT ATAAAAGTCT ACTTGATGTT TGGTATTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2005      2015      2025      2035      2045
AAGTAACTAA ACATTAAAAG ACTATAAATT TATATGTAAA CAATATTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2055      2065      2075      2085      2095
ATTTATTAAA AGAAATTGAC GGATGGATTT TATGGATCCG CGGCTTAGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2105      2115      2125      2135      2145
CTATGCCTAT CAATTTAAAT TTGTTATGCA TAGTGCCTGT GTTAGACGAG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2155      2165      2175      2185      2195
GTGTCTAACC TGTCAGATGC TCTGATGGTA TGCTCGTAGA TTATTATTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2205      2215      2225      2235      2245
TATTATTATT ATAGTAAACT ACCAGTCATG CTTGGAGCGA CAGGATAGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2255      2265      2275      2285      2295
CTGTGTACAA CACTGTGCTA GGCTCAAAGA GGAGTGCAGG ACTACGGACC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2305      2315      2325      2335      2345
GGCTCCCGCC TCATTTGTTG TTAATTTAAT TACTATTATT ACACTGTTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2355      2365      2375      2385      2395
AGCTAACTAA ATTAGATTTA ATTCTGATTT TGTTAGTTGA CTTATGGCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2405      2415      2425      2435      2445
GCACCTGATT GCTAGTCAAT TGGACTGCAT GTGACGATCG CCTAGCGGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2455      2465      2475      2485      2495
CCTTATCCTA GGCTCGATCG GTAAATCGAA ATGTTTGTTT TCATTAATTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2505      2515      2525      2535      2545
TCATTAATGA AACAAATATT GTACAACTTT AAGCGGTGGA TCACTCGGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2555      2565      2575      2585      2595
CGTGTGTCGA TGAAGAGTGC AGCCAACGTG GTGAATTAAT GTGAACTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2605      2615      2625      2635      2645
TACTGCTTTG AACATCGACC TCTTGAACGC ATATTGCGGC CACGGGATAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2655      2665      2675      2685      2695
CCTGTGGCCA CGCCTGGCCG AGGGTCGGCT TATAAACTAT CACGATGCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2705      2715      2725      2735      2745
AAAAAGTCGT GGATTGGATG CTGTGCCAGC TGGCATGATT TCCTCAATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2755      2765      2775      2785      2795
AGTATTTAAT TAATATACTA ACATATGAGG TGCCAGATCT ATGGCTCCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2805      2815      2825      2835      2845
CCTAATGTAT CCGGTTACAG CCAAGTCTAT ATTTATTATT ATTAAATGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2855      2865      2875      2885      2895
AAAATTGCTG TATTACTGGA TTATGCTCAG GTCGTGGCTC AATGATTTTG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2905      2915      2925      2935      2945
AACACGCTTG ATGTTATAAT CCATATATTA ATTATATAAA TATAGACATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2955      2965      2975      2985      2995
GGATTATTTT GTAGCCGATG GAGTGTAAAT ACTCTATAAT ATGGGGTAATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3005      3015      3025      3035      3045
TATTGATTTA TATGATACCC TAATTATATA TATTATGACC CTGACCTCGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3055      3065      3075      3085      3095
ATCAGACGTG ATTACCCGCT GAACTTAAGC ATATCACTAA GCGGAGGAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3105      3115      3125      3135      3145
AGAAACTAAC CAGGATTCCC CCAGTAACGG CGAGTGAACG GGGATTAGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3155      3165      3175      3185      3195
CAGCACCGAA GCCTGTGACC ATTTGGTTAC TAGGCAATGT GGTGTTTAGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3205      3215      3225      3235      3245
TCAACTTATG GCATTATTGC TCTACCCTAA GTCCAGCAAT GAGTACGGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3255      3265      3275      3285      3295
TACTGGAATG GCCCATAGAG GGTGAAAGGC CCGTAAGGGT AGAGACCAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3305      3315      3325      3335      3345
TGGACAATAA TGCCCTTAGT AGACCTTGGA GTCGGGTTGT TTGTGAATGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3355      3365      3375      3385      3395
AGCCCAAAAT GGGTGGTAAA CTCCATCTAA GGCTAAATAC TGACACGAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3405      3415      3425      3435      3445
CCGATAGCGA ACAAGTACCG TGAGGGAAAG TTGAAAAGTA CTTTGAAGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3455      3465      3475      3485      3495
AGGGTAAACA GTGCGTGAAA CCGCTTAAAG GTAAACGGGT GGAGTTGAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3505      3515      3525      3535      3545
TGTAAGCCTT GGAATTCAA CTGGTAAGTA TTACATGAGC TTGGGCATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3555      3565      3575      3585      3595
TTGGTCGACT TTTAAAGTCT GCTTAGTTGC GGGTCCTTGA CCTTTATTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3605      3615      3625      3635      3645
TTAAGGATGT GCGATGCACT ATTAAAGTGC TGTGCACTTT AAAAGTTGAA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3655      3665      3675      3685      3695
GGCCTGCTTG CCAGTGCACT TTCCCTTGGT GATCACCACG ACCGGCGCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3705      3715      3725      3735      3745
CTGTCTGTTT ACTTTGATCA AACCGATTTT GTCTAACCTT TATGATTAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3755      3765      3775      3785      3795
CCTAATCGGG ATGGCAGGTA GCTCATTGGT TAATTGTTAG CTTTGTGTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3805      3815      3825      3835      3845
CAATTATCTT TGGGTGTAAT CAGCTGATCA TTGTAAATCT GTGCAGTGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3855      3865      3875      3885      3895
CCGGAGATGA CGGCTATGGT GTGTGCATAC GTGCTTTGCT AATTGATGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3905      3915      3925      3935      3945
GCTTAGTCTG ATCGGATTTG TTTACTCACT TTTGTGGGTC TGCTGATGGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3955      3965      3975      3985      3995
TAAGCTTCGT TCGATTATCG GTAGCGTATG TGACACTAAA TTGGGCCAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4005      4015      4025      4035      4045
AGTCTGTGGT GTTGCGGTAG ACGATCCACC TGACCCGTCT TGAAACACGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4055      4065      4075      4085      4095
ACCAAGGAGT TTAACATGTG CGCGAGTCAT TGGGCGTTAC GAAACCCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4105      4115      4125      4135      4145
GGCGTAGTGA AAGTAAAGGC TTAGCTTGTC TAAGCTGTGG TGAGATCCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4155      4165      4175      4185      4195
CCGTTTCTCG TGCCTGGTAC CACCAAGCGT TTGAGCGGTA GGCGCATCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4205      4215      4225      4235      4245
CAGCCCGTCT CATGGTGTAG TCATGTAACT TGTTATATGC ATCACCGGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4255      4265      4275      4285      4295
CGGAGCTTGA GCGTACACGT TGAGACCCGA AAGATGGTGA ACTATGCTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4305      4315      4325      4335      4345
CGCAGGTTGA AGCCAGAGGA AACTCTGGTG GAGGACCGTA GCGATTCTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4355      4365      4375      4385      4395
CGTGCAAATC GATCGTCTAA CGTGAGTATA GGGGCGAAAG ACTAATCGAA

```

.....|.....||.....||.....||.....|
4405 4415 4425 4435
GGTTCCCTCC GAAGTTTCCC TCAGGATAGC ATGGTGAAC TACA

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 1837 – участок 18S.

1838 – 2521 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

2522 – 2681 – участок 5.8S.

2682 – 3039 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

3040 – 4444 – участок 28S.

**Нуклеотидная последовательность рДНК *Leucochloridium vogtianum*,
включающая участок 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S**

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5          15          25          35          45
GACGATCATG CSTTTGTACA CACCGCCCGT CGCTACTACC GATTGAATGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  55          65          75          85          95
TTTAGCAAGG TCCTCGGATT GGTGATGTTG AGTGACTTTT GTCACATGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 105          115          125          135          145
CTGTGCCAAG AAGACGACCG AACCTTGATCA TTTAGAGGAA GTAAAAGTCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 155          165          175          185          195
TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATTA CAAATCCCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 205          215          225          235          245
ATTATTA AAC CATTATTATC ATACATGCAT ATATTGTTTT GGGGAGGTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 255          265          275          285          295
GGGTGTGGTT GTGAACCGTA TAAGTCTACT TGATGTTTGG TATTTAAAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 305          315          325          335          345
TAACTAAACA TTAAGAGACT ATAAAAAGAC TGTGTAAACA ATAATAAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 355          365          375          385          395
ATACTTATTT AACCAAAGAA ATTAACGGAT GGATCTTATG GATCCGCGGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 405          415          425          435          445
TTAGGGCTAT GCCTGGCAAT TCAAATTTGT TATGCATAGT GCCTGTGTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 455          465          475          485          495
GACGAGGTGT CTAACCTGTC AGATGCTCTG ATGGTATGCT CGTAGTTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 505          515          525          535          545
TATTATAATA AASTATCAGT CATGCTTAGA GCGACAGGAT AGTACTGTGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 555          565          575          585          595
ACAACACTGT GCTAGGCTCA AAGAGGAGTG CAGGACTACG GACCGGCTCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 605          615          625          635          645
CGCSTCATTT GTTGTTATTT TAATTA CTAT TATTACACTG TTTAAGCTAA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  655      665      675      685      695
CTAAATTAGA TTTAATTCTG ATTTTGTTAG TTGAATAATG GCATGCACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  705      715      725      735      745
GATTGCTAGT CAATTGGACT GCATGTGACG ATCGCCTAGC GGTGCCTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  755      765      775      785      795
CCTAGGCTCG ATCGGTAAAC CGAAATGTTT GTTTTCATTA ATTTAATGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  805      815      825      835      845
ACAAATATAT TGTACAACCT TAAGCGGTGG ATCACTCGGC TCGTGTGTCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  855      865      875      885      895
ATGAAGAGTG CAGCCAACCT TGTGAATTAA TGTGAACTGC ATACTGCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  905      915      925      935      945
GAACATCCAC CTCTTGAACG CATATTGCGG CCACGGGATA TCCTGTGGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  955      965      975      985      995
ACGCCTGGCC GAGGGTCGGC TTATAAACTA TCACGATGCC CAAAAAGTCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1005     1015     1025     1035     1045
TGGATTGGAT GCTGTGCCAG CTGGCATGAT TTCCTCAATG TAGTATTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1055     1065     1075     1085     1095
TATACAAACA TATGAGGTGC CAGATCTATG GCTCCGTCCT AATGTATCCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1105     1115     1125     1135     1145
GTTACAGCCA AGTCTATATT TATTATAATA TTAAATGAAA TTGCTGTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1155     1165     1175     1185     1195
GGATTATGCT CAGGTCGTGG CTCAATGATT TTGAACACGC TTGATGTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1205     1215     1225     1235     1245
AATTTATATA TATACAAATA TAGATATTGG ATTATTTTGT AGCCGAAGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1255     1265     1275     1285     1295
GTGTAAATAC TCTGTAATTT GGGTGATTAA TTGATTTATA TGATACCCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1305     1315     1325     1335     1345
ATTATATATG TATTATGACC CTGACCTCGG ATCAGACGTG ATTACCCGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1355     1365     1375     1385     1395
GAACTTAAGC ATATCACTAA GCGGAGGAAA AGAACTAAC CAGGATTTCC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1405      1415      1425      1435      1445
CCAGTAACGG CGAGTGAACG GGGATTAGCC CAGCACCGAA GCCTGTGACC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1455      1465      1475      1485      1495
ATTTGGTTAC TAGGCAATGT GGTGTTTAGG TCAACTTATG GCATTATTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1505      1515      1525      1535      1545
TCTACCCTAA TTCCAGCAAT GATTACGGCT TACTGGAATG GCCCATAGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1555      1565      1575      1585      1595
GGTGAAAGGC CCGTAAGGGT ATAGGCCAAA TGGACAATAA TGCCCTTAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1605      1615      1625      1635      1645
AGACCTTGGA GTCGGGTTGT TTGTGAATGC AGCCCAAAAT GGGTGGTAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1655      1665      1675      1685      1695
CTCCATCTAA GGCTAAATAC TGACACGAGT CCGATAGCGA ACAAGTACCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1705      1715      1725      1735      1745
TGAGGGAAAG TTGAAAAGTA CTTTGAAGAG AGGGTAAACA GTGCGTGAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1755      1765      1775      1785      1795
CCGCTTAAAG GTAAACGGGT GGAGTTGAAC TGTAAGCCTT GGGAAATCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1805      1815      1825      1835      1845
CTGGTAAGTA TTACATGAGC TTGGGCATTA TTGGTCGACT TTTAAAGTCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1855      1865      1875      1885      1895
GCTTAGTTGC GGGTCCTTGA CCTTTATTGG TTAAGGATGT GCGATGCACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1905      1915      1925      1935      1945
ATTAAAGTGC TGTGCACTTT AAAAGTTGAA GGCCTGCTTG CCAGTGCACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1955      1965      1975      1985      1995
TTCCCTTGGT GATCACCACG ACCGGCGCTG CTGTCTGTTT ACTTTGATCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2005      2015      2025      2035      2045
AACCGATTTT GTCTAACCTT TATGATTAGA CCTAATCGGG ATGGCAGGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2055      2065      2075      2085      2095
GCTCATTGGT TAATTGTTAG CTTTTGTTAA CAATTATCTT TGGGTGTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2105      2115      2125      2135      2145
TAGCTGGTCA TTGTAAATCT GTGCAGTGCG CCGGAGATGA CGGCTATGGT

```

.....|.....| ...
2155
GTGTGCATAC GTG

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 119 – участок 18S.

120 – 812 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

813 – 972 – участок 5.8S.

973 – 1319 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

1320 – 2163 – участок 28S.

Расположение специфических праймеров на нуклеотидной последовательности рДНК *Leucochloridium* sp.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5      15      25      35      45
TGCGAATGGC TCATTAATC AGCTATGGTT CCTTAGATCA TAAATACTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   55     65     75     85     95
ATGGATAACT GTAGTAATTC TAGAGCTAAT ACATGCCACT ATGCCCTGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  105    115    125    135    145
CCGCAAGGGA ATGGGTGGAT TTATTAGAAC AGAACCAACC AGAAATAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  155    165    175    185    195
TCGGCTATTT CTGTTGTA CTGTGATGAC TCTGGATAAC TTCACTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  205    215    225    235    245
GCAGTCGACC TTGTGTCGGC GACGGATCTT TCAAATATCT GCCCTATCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  255    265    275    285    295
CTGTTCGATGG TAGGTGACCT GCCTACCATG GTGATAACGG GTAACGGGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  305    315    325    335    345
ATCAGGGTTC GATTCCGGAG AGGGAGCCTG AGAAACGGCT ACCACTTCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  355    365    375    385    395
AGGAAGGCAG CAGGCGCGAA AATTACCCAC TCCCGGCACG GGGAGGTAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  405    415    425    435    445
GACGAAAAAT ACGAATACGG GACTCAATTG AGGCTCCGTA ATTCGAATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  455    465    475    485    495
GTACACTTTA AATCSTTTAA CGAGGACCAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  505    515    525    535    545
CAGCAGCCGC GGTAACSTCA GCTCCAAAAG CGTATATTAA AGTTGCTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  555    565    575    585    595
GTTAAAAAGC TCGTAGTTGG ATCTGGGTCG TGTGGTCACA TACCGTTGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  605    615    625    635    645
TGTTCTACTA TCTTGATTAA AATCGAGACA GTAGTACGGG TCGGTGTAGT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  655      665      675      685      695
GACCGTGCAA CCTTTCAGTC GTGTCTGTGT AACAGGTGT TGGTTTAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  705      715      725      735      745
AATAGGTTTCG CCCTATTAGC TTGCTAACAT GCTTCCGGAT GCCTTTAAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  755      765      775      785      795
GGGTGTCGGG GGCAGACGAC ACTTTTACTT TGAACAAATT TGAGTGCTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  805      815      825      835      845
AAGCAGGCTT GTATGCCTGA AAATTCTTGC ATGGAATAAT AGAATAGGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  855      865      875      885      895
TTCGGTTCTA TTTTGTGGT TCTCGGATCC GAAGTAATGG TTAAGAGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  905      915      925      935      945
CAGACGGGGG CATTTGTATG GCGGTGTTAG AGGTGAAATT CTTGGATCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  955      965      975      985      995
CGCCAGACAA ACTACAGCGA AAGCATTTGC CAAGAATGTT TTCATTGATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1005     1015     1025     1035     1045
AGGAGCGAAA GTCAGAGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CCTAGTTCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1055     1065     1075     1085     1095
ACCATAAACG ATGCCAACTG ACGATCCGCG GTGGTTCTTT AATTGGCTCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1105     1115     1125     1135     1145
GCGGGCAGTC CCCGGGAAAC CTTTAAGTCT TTGGGCTCCG GGGGAAGTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1155     1165     1175     1185     1195
GGTTGCAAAG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1205     1215     1225     1235     1245
TGGAGCCTGC GGCTTAATTC GACTCAACAC GGGAAAATC ACCCGGCCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1255     1265     1275     1285     1295
GACACTGTGA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTTGAT TCGGTGGTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1305     1315     1325     1335     1345
GTGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG CGATTTGTCT GGTAAATTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 1355     1365     1375     1385     1395
GATAACGAAC GAGACTTTGA CCTACTAAAT AGTTCGCTG TCCTCTGTGC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1405      1415      1425      1435      1445
TCGTGCAGAT TCGCGCTTCT ACTGCCTCTT CGAGGGGTGA TAGGGTCGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1455      1465      1475      1485      1495
AATCGACGGG TACGGTGCAG GTGTAACTT CTTAGAGGGA CAAGCGGCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1505      1515      1525      1535      1545
ACAAGTCGCA CGAAATTGAG CAATAACAGG TCTGTGATGC CCTTAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1555      1565      1575      1585      1595
CCGGGGCCGC ACGTGCCTA CAATGACGGT GTCAGCGAGT CTGGAAACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1605      1615      1625      1635      1645
GGCCCCGAAAG GGTGGGTAA ACTGTTCCAT CACCGTCGTG ACTGGGATCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1655      1665      1675      1685      1695
GGGCTTGCAA TTATTCCCCG TGAACGAGGA ATTCCTGGTA AGTGCAAGTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1705      1715      1725      1735      1745
ATAAGCCTTGC GCTGATTACG TCCCTGCCCT TTGTACACAC CGCCCGTCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1755      1765      1775      1785      1795
TACTACCGAT TGAATGGTTT AGCAAGGTCC TCGGATTGGT GATGTTGTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1805      1815      1825      1835      1845
TGACTTTTGT CACATGAACT GTGCCAAGAA GACGACCGAA CTTGATCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1855      1865      1875      1885      1895
TAGAGGAAGT AAAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1905      1915      1925      1935      1945
GATCATTACA AATCCCTAAT TATTAAACCA TTATTATCAT ACATATGTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  1955      1965      1975      1985      1995
ATGTGTGCAT GTATGTATGT ATAAAAGTCT ACTTGATGTT TGGTATTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2005      2015      2025      2035      2045
AAGTAACTAA ACATTAAGG ACTATAAATT TATATGTAAA CAATATTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2055      2065      2075      2085      2095
ATTTATTAAA AGAAATTGAC GGATGGATTT TATGGATCCG CGGCTTAGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2105      2115      2125      2135      2145
CTATGCCTAT CAATTTAAAT TTGTTATGCA TAGTGCCTGT GTTAGACGAG

```

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2155 2165 2175 2185 2195
GTGCTAACC TGTCAGATGC TCTGATGGTA TGCTCGTAGA TTATTATTAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2205 2215 2225 2235 2245
TATTATTATT ATAGTAACT ACCAGTCATG CTTGGAGCGA CAGGATAGTA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2255 2265 2275 2285 2295
CTGTGTACAA CACTGTGCTA GGCTCAAAGA GGAGTGCAGG ACTACGGACC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2305 2315 2325 2335 2345
GGCTCCCGCC TCATTTGTTG TTAATTTAAT TACTATTATT ACACTGTTTA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2355 2365 2375 2385 2395
AGCTAACTAA ATTAGATTTA ATTCTGATTT TGTTAGTTGA CTTATGGCAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2405 2415 2425 2435 2445
GCACCTGATT GCTAGTCAAT TGGACTGCAT GTGACGATCG CCTAGCGGTG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2455 2465 2475 2485 2495
CCTTATCCTA GGCTCGATCG GTAAATCGAA ATGTTTGTTT TCATTAATTT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2505 2515 2525 2535 2545
TCATTAATGA AACAAATATT GTACAACTTT AAGCGGTGGA TCACTCGGCT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2555 2565 2575 2585 2595
CGTGTGTCGA TGAAGAGTGC AGCCAACGTG GTGAATTAAT GTGAACGCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2605 2615 2625 2635 2645
 TACTGCTTTG AACATCGACC TCTTGAACGC ATATTGCGGC CACGGGATAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2655 2665 2675 2685 2695
 CCTGTGGCCA CGCCTGGCCG AGGGTCGGCT **TATAAACTAT CACGATGCC**

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2705 2715 2725 2735 2745
AAAAAGTCGT GGATTGGATG CTGTGCCAGC TGGCATGATT TCCTCAATGT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2755 2765 2775 2785 2795
AGTATTTAAT TAATATACTA ACATATGAGG TGCCAGATCT ATGGCTCCAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2805 2815 2825 2835 2845
CCTAATGTAT CCGGTTACAG CCAAGTCTAT ATTTATTATT ATTAAATGAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 2855 2865 2875 2885 2895
AAAATTGCTG TATTACTGGA TTATGCTCAG GTCGTGGCTC AATGATTTTG

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2905      2915      2925      2935      2945
AACACGCTTG ATGTTATAAT CCATATATTA ATTATATAAA TATAGACATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  2955      2965      2975      2985      2995
GGATTATTTT GTAGCCGATG GAGTGTAAT ACTCTATAAT ATGGGTAATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3005      3015      3025      3035      3045
TATTGATTTA TATGATACCC TAATTATATA TATTATGACC CTGACCTCGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3055      3065      3075      3085      3095
ATCAGACGTG ATTACCCGCT GAACTTAAGC ATATCACTAA GCGGAGGAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3105      3115      3125      3135      3145
AGAAACTAAC CAGGATTCCC CCAGTAACGG CGAGTGAACG GGGATTAGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3155      3165      3175      3185      3195
CAGCACCGAA GCCTGTGACC ATTTGGTTAC TAGGCAATGT GGTGTTTAGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3205      3215      3225      3235      3245
TCAACTTATG GCATTATTGC TCTACCCTAA GTCCAGCAAT GAGTACGGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3255      3265      3275      3285      3295
TACTGGAATG GCCCATAGAG GGTGAAAGGC CCGTAAGGGT AGAGACCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3305      3315      3325      3335      3345
TGGACAATAA TGCCCTTAGT AGACCTTGGA GTCGGGTTGT TTGTGAATGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3355      3365      3375      3385      3395
AGCCCAAAT GGGTGGTAAA CTCCATCTAA GGCTAAATAC TGACACGAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3405      3415      3425      3435      3445
CCGATAGCGA ACAAGTACCG TGAGGGAAAG TTGAAAAGTA CTTTGAAGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3455      3465      3475      3485      3495
AGGGTAAACA GTGCGTGAAA CCGCTTAAAG GTAAACGGGT GGAGTTGAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3505      3515      3525      3535      3545
TGTAAGCCTT GGAATTCAA CTGGTAAGTA TTACATGAGC TTGGGCATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3555      3565      3575      3585      3595
TTGGTCGACT TTTAAAGTCT GCTTAGTTGC GGGTCCTTGA CCTTATTTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3605      3615      3625      3635      3645
TTAAGGATGT GCGATGCACT ATTAAAGTGC TGTGCACTT AAAAGTTGAA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3655      3665      3675      3685      3695
GGCCTGCTTG CCAGTGCAC T TCCCTTGGT GATCACCACG ACCGGCGCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3705      3715      3725      3735      3745
CTGTCTGTTT ACTTTGATCA AACCGATTTT GTCTAACCTT TATGATTAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3755      3765      3775      3785      3795
CCTAATCGGG ATGGCAGGTA GCTCATTGGT TAATTGTTAG CTTTGTGTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3805      3815      3825      3835      3845
CAATTATCTT TGGGTGTAAT CAGCTGATCA TTGTAAATCT GTGCAGTGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3855      3865      3875      3885      3895
CCGGAGATGA CGGCTATGGT GTGTGCATAC GTGCTTTGCT AATTGATGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3905      3915      3925      3935      3945
GCTTAGTCTG ATCGGATTTG TTTACTCACT TTTGTGGGTC TGCTGATGGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  3955      3965      3975      3985      3995
TAAGCTTCGT TCGATTATCG GTAGCGTATG TGACACTAAA TTGGGCCAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4005      4015      4025      4035      4045
AGTCTGTGGT GTTGCGGTAG ACGATCCACC TGACCCGTCT TGAAACACGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4055      4065      4075      4085      4095
ACCAAGGAGT TTAACATGTG CGCGAGTCAT TGGGCGTTAC GAAACCCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4105      4115      4125      4135      4145
GGCGTAGTGA AAGTAAAGGC TTAGCTTGTC TAAGCTGTGG TGAGATCCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4155      4165      4175      4185      4195
CCGTTTCTCG TGCCTGTAC CACCAAGCGT TTGAGCGGTA GGCGCATCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4205      4215      4225      4235      4245
CAGCCCGTCT CATGGTGTAG TCATGTAACT TGTTATATGC ATCACCGGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4255      4265      4275      4285      4295
CGGAGCTTGA GCGTACACGT TGAGACCCGA AAGATGGTGA ACTATGCTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4305      4315      4325      4335      4345
CGCAGGTTGA AGCCAGAGGA AACTCTGGTG GAGGACCGTA GCGATTCTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  4355      4365      4375      4385      4395
CGTGCAAATC GATCGTCTAA CGTGAGTATA GGGGCGAAAG ACTAATCGAA

```

.....|.....||.....||.....||.....|
 4405 4415 4425 4435
 CСATCTAGTA GCTGGTTCCC TCCGAAGTTT CCCTCAGGAT AGCA

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.
CGCAGGTTGA – внутренние транскрибируемые спейсеры.

Координаты праймеров:

- 1F – 2167-2189
- 1R – 3079-3100
- 2F – 1683-1705
- 2R – 2552-2572
- 3F – 2766-2789
- 3R – 3225-3245
- 4F – *C. elegans* (X03680.1)
- 4R – 277-296
- 5F – 3333-3352
- 5R – 3934-3954
- 6F – 4167-4186
- 6R – *S. japonicum* (EU83570.6)
- 7F – *S. japonicum* (M62652.1)
- 7R – 80-100

**Сравнение нуклеотидных последовательностей рДНК трематод
L. vogtianum и *L. perturbatum***

	5	15	25	35	45
L.perturba	-ACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG
L.vogtianu	GACGATCATG	-CCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG

	55	65	75	85	95
L.perturba	GTTTAGCAAG	GTCCTCGGAT	TGGTGATGTT	GTAGTGACTT	TTGTCACATG
L.vogtianu	GTTTAGCAAG	GTCCTCGGAT	TGGTGATGTT	G-AGTGACTT	TTGTCACATG

	105	115	125	135	145
L.perturba	AACTGTGCCA	AGAAGACGAC	CGAACTTGAT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAAGT
L.vogtianu	AACTGTGCCA	AGAAGACGAC	CGAACTTGAT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAAGT

	155	165	175	185	195
L.perturba	CGTAACAAGG	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACAAATCCC
L.vogtianu	CGTAACAAGG	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACAAATCCC

	205	215	225	235	245
L.perturba	TAATTATTAA	ACCATTATTA	TCAT--A--C	--ATA-TG--	-T--GCATGT
L.vogtianu	TAATTATTAA	ACCATTATTA	TCATACATGC	ATATATTTGTT	TTGGGGAGGT

	255	265	275	285	295
L.perturba	GTGCATGTAT	GTATGTA---	TAAAAGTCTA	CTTGATGTTT	GGTATTTAAA
L.vogtianu	GGGGGTGTGG	TTGTGAACCG	TATAAGTCTA	CTTGATGTTT	GGTATTTAAA

	305	315	325	335	345
L.perturba	AGTAACTAAA	CATTAAGA	CTATAAATTT	A-TATGTAAA	CAATATTA--
L.vogtianu	AGTAACTAAA	CATTAAGAGA	CTATAAAAAG	ACTGTGTAAA	CAATAATAAG

	355	365	375	385	395
L.perturba	-TAT--TTA-	TT-A--AAAG	AAATTGACGG	ATGGATTTTA	TGGATCCGCG
L.vogtianu	TTATACTTAT	TTAACCAAAG	AAATTAACGG	ATGGATCTTA	TGGATCCGCG

	405	415	425	435	445
L.perturba	GCTTAGGGCT	ATGCCTATCA	ATTTAAATTT	GTTATGCATA	GTGCTGTGT
L.vogtianu	GCTTAGGGCT	ATGCCTGGCA	ATTCAAATTT	GTTATGCATA	GTGCTGTGT

	455	465	475	485	495
L.perturba	TAGACGAGGT	GTCTAACCTG	TCAGATGCTC	TGATGGTATG	CTCGTAGATT
L.vogtianu	TAGACGAGGT	GTCTAACCTG	TCAGATGCTC	TGATGGTATG	CTCGTAG---

	505	515	525	535	545
L.perturba	ATTATTATTA	TTATTATTAT	AGTAAACTAC	CAGTCATGCT	TGAGCGACA
L.vogtianu	-----T-	TTATTATTAT	AATAAACTAT	CAGTCATGCT	TAGAGCGACA

	555	565	575	585	595
L.perturba	GGATAGTACT	GTGTACAACA	CTGTGCTAGG	CTCAAAGAGG	AGTGCAGGAC
L.vogtianu	GGATAGTACT	GTGTACAACA	CTGTGCTAGG	CTCAAAGAGG	AGTGCAGGAC

	605	615	625	635	645
L.perturba	TACGGACCGG	CTCCCGCCTC	ATTTGTTGTT	AATTTAATTA	CTATTATTAC
L.vogtianu	TACGGACCGG	CTCCCGCCTC	ATTTGTTGTT	AATTTAATTA	CTATTATTAC

	655	665	675	685	695
L.perturba	ACTGTTTAAAG	CTAACTAAAT	TAGATTTAAT	TCTGATTTTG	TTAGTTGACT
L.vogtianu	ACTGTTTAAAG	CTAACTAAAT	TAGATTTAAT	TCTGATTTTG	TTAGTTGAAT

	705	715	725	735	745
L.perturba	TATGGCATGC	ACCTGATTGC	TAGTCAATTG	GACTGCATGT	GACGATCGCC
L.vogtianu	AATGGCATGC	ACCTGATTGC	TAGTCAATTG	GACTGCATGT	GACGATCGCC

	755	765	775	785	795
L.perturba	TAGCGGTGCC	TTATCCTAGG	CTCGATCGGT	AAATCGAAAT	GTTTGTTTTC
L.vogtianu	TAGCGGTGCC	TTATCCTAGG	CTCGATCGGT	AAACCGAAAT	GTTTGTTTTC

	805	815	825	835	845
L.perturba	ATTAATTTTC	ATTAATGAAA	C-AA-ATATT	GTACAAC TTT	AAGCGGTGGA
L.vogtianu	ATTAA---T-	-TTAATGAAA	CAAATATATT	GTACAAC TTT	AAGCGGTGGA

	855	865	875	885	895
L.perturba	TCACTCGGCT	CGTGTGTCGA	TGAAGAGTGC	AGCCAAC TGT	GTGAATTAAT
L.vogtianu	TCACTCGGCT	CGTGTGTCGA	TGAAGAGTGC	AGCCAAC TGT	GTGAATTAAT

	905	915	925	935	945
L.perturba	GTGAACTGCA	TACTGCTTTG	AACATCGACC	TCTTGAACGC	ATATTGCGGC
L.vogtianu	GTGAACTGCA	TACTGCTTTG	AACATCCACC	TCTTGAACGC	ATATTGCGGC

	955	965	975	985	995
L.perturba	CACGGGATAT	CCTGTGGCCA	CGCCTGGCCG	AGGGTCGGCT	TATAAACTAT
L.vogtianu	CACGGGATAT	CCTGTGGCCA	CGCCTGGCCG	AGGGTCGGCT	TATAAACTAT

	1005	1015	1025	1035	1045
L.perturba	CACGATGCC	AAAAAGTCGT	GGATTGGATG	CTGTGCCAGC	TGGCATGATT
L.vogtianu	CACGATGCC	AAAAAGTCGT	GGATTGGATG	CTGTGCCAGC	TGGCATGATT

	1055	1065	1075	1085	1095
L.perturba	TCCTCAATGT	AGTATTTAAT	TAATATACTA	ACATATGAGG	TGCCAGATCT
L.vogtianu	TCCTCAATGT	AGTA--T--T	TAATATACAA	ACATATGAGG	TGCCAGATCT

	1105	1115	1125	1135	1145
L.perturba	ATGGCTCCAT	CCTAATGTAT	CCGTTACAG	CCAAGTCTAT	ATTTATTAT-
L.vogtianu	ATGGCTCCGT	CCTAATGTAT	CCGTTACAG	CCAAGTCTAT	ATTTATTATA

	1155	1165	1175	1185	1195
L.perturba	-TATTAAATG	ATAAAATTGC	TGTATTACTG	GATTATGCTC	AGGTCGTGGC
L.vogtianu	ATATTAAATG	---AAATTGC	TGTA--A-TG	GATTATGCTC	AGGTCGTGGC

	1205	1215	1225	1235	1245
L.perturba	TCAATGATTT	TGAACACGCT	TGATGTTATA	ATCCA TATAT	TAATTATATA
L.vogtianu	TCAATGATTT	TGAACACGCT	TGATGTTATA	AT--TATA-	T-A-TATACA

	1255	1265	1275	1285	1295
L.perturba	AATATAGACA	TTGGATTATT	TTGTAGCCGA	TGGAGTGTA	ATACTCTATA
L.vogtianu	AATATAGATA	TTGGATTATT	TTGTAGCCGA	AGGAGTGTA	ATACTCTGTA

	1305	1315	1325	1335	1345
L.perturba	ATATGGGTAA	TTTATTGATT	TATATGATAC	CCTAATTATA	TA--TATTAT
L.vogtianu	ATTTGGGTGA	TTAATTGATT	TATATGATAC	CCTAATTATA	TATGTATTAT

	1355	1365	1375	1385	1395
L.perturba	GACCCTGACC	TCGGATCAGA	CGTGATTACC	CGCTGAACTT	AAGCATATCA
L.vogtianu	GACCCTGACC	TCGGATCAGA	CGTGATTACC	CGCTGAACTT	AAGCATATCA

	1405	1415	1425	1435	1445
L.perturba	CTAAGCGGAG	GAAAAGAAAC	TAACCAGGAT	TCCCCCAGTA	ACGGCGAGTG
L.vogtianu	CTAAGCGGAG	GAAAAGAAAC	TAACCAGGAT	TCCCCCAGTA	ACGGCGAGTG

	1455	1465	1475	1485	1495
L.perturba	AACGGGGATT	AGCCAGCAC	CGAAGCCTGT	GACCATTTGG	TTACTAGGCA
L.vogtianu	AACGGGGATT	AGCCAGCAC	CGAAGCCTGT	GACCATTTGG	TTACTAGGCA

	1505	1515	1525	1535	1545
L.perturba	ATGTGGTGTT	TAGGTCAACT	TATGGCATT	TTGCTCTACC	CTAAGTCCAG
L.vogtianu	ATGTGGTGTT	TAGGTCAACT	TATGGCATT	TTGCTCTACC	CTAAGTCCAG

	1555	1565	1575	1585	1595
L.perturba	CAATGAGTAC	GGCTTACTGG	AATGGCCCAT	AGAGGGTGAA	AGGCCCGTAA
L.vogtianu	CAATGATTAC	GGCTTACTGG	AATGGCCCAT	AGAGGGTGAA	AGGCCCGTAA

	1605	1615	1625	1635	1645
L.perturba	GGGTAGAGAC	CAAATGGACA	ATAATGCCCT	TAGTAGACCT	TGGAGTCGGG
L.vogtianu	GGGTATAGGC	CAAATGGACA	ATAATGCCCT	TAGTAGACCT	TGGAGTCGGG

	1655	1665	1675	1685	1695
L.perturba	TTGTTTGTGA	ATGCAGCCCA	AAATGGGTGG	TAAACTCCAT	CTAAGGCTAA
L.vogtianu	TTGTTTGTGA	ATGCAGCCCA	AAATGGGTGG	TAAACTCCAT	CTAAGGCTAA

	1705	1715	1725	1735	1745
L.perturba	ATACTGACAC	GAGTCCGATA	GCGAACAAAGT	ACCGTGAGGG	AAAGTTGAAA
L.vogtianu	ATACTGACAC	GAGTCCGATA	GCGAACAAAGT	ACCGTGAGGG	AAAGTTGAAA

	1755	1765	1775	1785	1795
L.perturba	AGTACTTTGA	AGAGAGGGTA	AACAGTGCGT	GAAACCGCTT	AAAGGTAAAC
L.vogtianu	AGTACTTTGA	AGAGAGGGTA	AACAGTGCGT	GAAACCGCTT	AAAGGTAAAC

	1805	1815	1825	1835	1845
L.perturba	GGGTGGAGTT	GAAGTGTAAAG	CCTTGGGAAT	TCAACTGGTA	AGTATTACAT
L.vogtianu	GGGTGGAGTT	GAAGTGTAAAG	CCTTGGGAAT	TCAACTGGTA	AGTATTACAT

	1855	1865	1875	1885	1895
L.perturba	GAGCTTGGGC	ATTATTGGTC	GACTTTTAAA	GTCTGCTTAG	TTGCGGGTCC
L.vogtianu	GAGCTTGGGC	ATTATTGGTC	GACTTTTAAA	GTCTGCTTAG	TTGCGGGTCC

	1905	1915	1925	1935	1945
L.perturba	TTGACCTTTA	TTGGTAAAGG	ATGTGCGATG	CACTATTAAA	GTGCTGTGCA
L.vogtianu	TTGACCTTTA	TTGGTAAAGG	ATGTGCGATG	CACTATTAAA	GTGCTGTGCA

	1955	1965	1975	1985	1995
L.perturba	CTTTAAAAGT	TGAAGGCCTG	CTTGCCAGTG	CACTTTCCCT	TGGTGATCAC
L.vogtianu	CTTTAAAAGT	TGAAGGCCTG	CTTGCCAGTG	CACTTTCCCT	TGGTGATCAC

	2005	2015	2025	2035	2045
L.perturba	CACGACCGGC	GCTGCTGTCT	GTTTACTTTG	ATCAAACCGA	TTTGTCTAA
L.vogtianu	CACGACCGGC	GCTGCTGTCT	GTTTACTTTG	ATCAAACCGA	TTTGTCTAA

	2055	2065	2075	2085	2095
L.perturba	CSTTTATGAT	TAGACCTAAT	CGGGATGGCA	GGTAGCTCAT	TGGTTAATTG
L.vogtianu	CSTTTATGAT	TAGACCTAAT	CGGGATGGCA	GGTAGCTCAT	TGGTTAATTG

	2105	2115	2125	2135	2145
L.perturba	TTAGCTTTTG	TTAACAATTA	TCTTTGGGTG	TAATCAGCTG	ATCATTGTA
L.vogtianu	TTAGCTTTTG	TTAACAATTA	TCTTTGGGTG	TAATTAGCTG	GTCATTGTAA

	2155	...			
L.perturba	ATCTGTGCAG	TGC			
L.vogtianu	ATCTGTGCAG	TGC			

Цветом выделены полиморфизмы.

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 119 – участок 18S.

120 – 812 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

813 – 972 – участок 5.8S.

973 – 1319 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

1320 – 2163 – участок 28S.

**Сравнение нуклеотидных последовательностей рДНК трематод
L. vogtianum и *L. paradoxum***

	5	15	25	35	45
L.paradox	GACGATCATG	-CCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG
L.vogtianu	TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG

	55	65	75	85	95
L.paradox	GTTTAGCAAG	GTCCTCGGAT	TGGTGATGTT	G-AGTGACTT	TTGTCACATG
L.vogtianu	GTTTAGCAAG	GTCCTCGGAT	TGGTGATGTT	GTAGTGACTT	TTGTCACATG

	105	115	125	135	145
L.paradox	AACTGTGCCA	AGAAGACGAC	CGAACTTGAT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAAGT
L.vogtianu	AACTGTGCCA	AGAAGACGAC	CGAACTTGAT	CATTTAGAGG	AAGTAAAAAGT

	155	165	175	185	195
L.paradox	CGTAACAAGG	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACAAATCCC
L.vogtianu	CGTAACAAGG	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACAAATCCC

	205	215	225	235	245
L.paradox	TAATTATTAA	ACCATTATTA	TCATACATGC	ATATATTGTT	TTGGGGAGGT
L.vogtianu	TAATTATTAA	ACCATTATTA	TCAT--A--C	--ATA--TG--	--T--GCATGT

	255	265	275	285	295
L.paradox	GGGGGTGTGG	TTGTGAACCG	TATAAGTCTA	CTTGATGTTT	GGTATTTAAA
L.vogtianu	GTGCATGTAT	GTATGTA---	TAAAAGTCTA	CTTGATGTTT	GGTATTTAAA

	305	315	325	335	345
L.paradox	AGTAACTAAA	CATTAAAGAGA	CTATAAAAAG	ACTGTGTAAA	CAATAATAAG
L.vogtianu	AGTAACTAAA	CATTAAAAGA	CTATAAATTT	A-TATGTAAA	CAATATATAA-

	355	365	375	385	395
L.paradox	TTATACTTAT	TTAACCAAAG	AAATTAACGG	ATGGATCTTA	TGGATCCGCG
L.vogtianu	-TAT--TTA-	TT-A--AAAG	AAATTGACGG	ATGGATTTTA	TGGATCCGCG

	405	415	425	435	445
L.paradox	GCTTAGGGCT	ATGCCTGGCA	ATTCAAAATTT	GTTATGCATA	GTGCTGTGT
L.vogtianu	GCTTAGGGCT	ATGCCTATCA	ATTTAAAATTT	GTTATGCATA	GTGCTGTGT

	455	465	475	485	495
L.paradox	TAGACGAGGT	GTCTAACCTG	TCAGATGCTC	TGATG-GT-A	-TGCT-C--G
L.vogtianu	TAGACGAGGT	GTCTAACCTG	TCAGATGCTC	TG-TGTGTAA	GTTTCAGCGGG

	505	515	525	535	545
L.paradox	---T-----	AG-T-TTATT	ATTATAATAA	ACTATCAGTC	ATGCTTAGAG
L.vogtianu	TAATCCCACC	AGATGTTGCT	ATCCTACTAA	TCTACCAGTC	ATGCTTAGAG

	555	565	575	585	595
L.paradox	CGACAGGATA	GTACTGTGTA	CAACACTGTG	CTAGGCTCAA	AGAGGAGTGC
L.vogtianu	CGACAGGATA	GTACTGTGTA	CAACACTGTG	CTAGGCTCAA	AGAGGAGTGC

	605	615	625	635	645
L.paradox	AGGACTACGG	ACCGGCTCCC	GCCTCATTTG	TTGTTATTTT	AATTACTATT
L.vogtianu	AGGACTACGG	ACCGGCTCCC	GCCTCATTTG	TTGTTATTTT	AATTACTATT

	655	665	675	685	695
L.paradox	ATTACACTGT	TTAAGCTAAC	TAAATTAGAT	TTAATTCTGA	TTTTGTTAGT
L.vogtianu	ATTACACTGT	TTAAGCTAAC	TAAATTAGAT	TTAATTCTGA	TTTTGTTAGT

	705	715	725	735	745
L.paradox	TGAATAATGG	CATGCACCTG	ATTGCTAGTC	AATTGGACTG	CATGTGACGA
L.vogtianu	TGAATAATGG	CATGCACCTG	ATTGCTAGTC	AATTGGACTG	CATGTGACGA

	755	765	775	785	795
L.paradox	TCGCCTAGCG	GTGCCTTATC	CTAGGCTCGA	TCGGTAAACC	GAAATGTTTG
L.vogtianu	TCGCCTAGCG	GTGCCTTATC	CTAGGCTCGA	TCGGTAAATC	GAAATGTTTG

	805	815	825	835	845
L.paradox	TTTTCATTTAA	TTTAATGAAA	CAAATATATT	GTACAACCTT	AAGCGGTGGA
L.vogtianu	TTTTCATTTAA	TTTAATGAAA	C-AA-ATATT	GTACAACCTT	AAGCGGTGGA

	855	865	875	885	895
L.paradox	TCACTCGGCT	CGTGTGTCGA	TGAAGAGTGC	AGCCAACCTGT	GTGAATTAAT
L.vogtianu	TCACTCGGCT	CGTGTGTCGA	TGAAGAGTGC	AGCCAACCTGT	GTGAATTAAT

	905	915	925	935	945
L.paradox	GTGAACTGCA	TACTGCTTTG	AACATCCACC	TCTTGAACGC	ATATTGCGGC
L.vogtianu	GTGAACTGCA	TACTGCTTTG	AACATCGACC	TCTTGAACGC	ATATTGCGGC

	955	965	975	985	995
L.paradox	CACGGGATAT	CCTGTGGCCA	CGCCTGGCCG	AGGGTCGGCT	TATAAACTAT
L.vogtianu	CACGGGATAT	CCTGTGGCCA	CGCCTGGCCG	AGGGTCGGCT	TATAAACTAT

	1005	1015	1025	1035	1045
L.paradox	CACGATGCC	AAAAAGTCGT	GGATTGGATG	CTGTGCCAGC	TGGCATGATT
L.vogtianu	CACGATGCC	AAAAAGTCGT	GGATTGGATG	CTGTGCCAGC	TGGCATGATT

	1055	1065	1075	1085	1095
L.paradox	TCCTCAATGT	AGTATTTAAT	ATACAAACAT	ATGAGGTGCC	AGATCTATGG
L.vogtianu	TCCTTAATGT	AGTATTTAAT	ATACATAACAT	ATGAGGTGCC	AGATCTATGG

	1105	1115	1125	1135	1145
L.paradox	CTCCGTCCTA	ATGTATCCGG	TTACAGCCAA	GTCTATATTT	ATTATAATAT
L.vogtianu	CTCCGTCCTA	ATGTATCCGG	TTACAGCCAA	GTCTATATTT	ATTATAATAT

	1155	1165	1175	1185	1195
L.paradox	TAAATGAAAT	TGCTGTAATG	GATTATGCTC	AGGTCGTGGC	TCAATGATTT
L.vogtianu	TAAATGAAAT	TGCTGTAATG	GATTATGCTC	AGGTCGTGGC	TCAATGATTT

	1205	1215	1225	1235	1245
L.paradox	TGAACACGCT	TGATGTTATA	ATTTATATAT	ATACAAATAT	AGATATTGGA
L.vogtianu	TGAACACGCT	TGATGTTATA	ATTTATATAT	ATATAAATAT	AGACATTGGA

	1255	1265	1275	1285	1295
L.paradox	TTATTTTGTA	GCCGAAGGAG	TGTAAATACT	CTGTAATTTG	GGTGATTAAT
L.vogtianu	TTATTTTGTA	GCCGAGGGAG	TGTAAATACT	CTATAATTTG	GGTAATTTAT

	1305	1315	1325	1335	1345
L.paradox	TGATTTATAT	GATACCCTAA	TTATATATGT	ATTATGACCC	TGACCTCGGA
L.vogtianu	TGATTTATAT	GATACCCTAA	TTATATA--T	ATTATGACCC	TGACCTCGGA

	1355	1365	1375	1385	1395
L.paradox	TCAGACGTGA	TTACCCGCTG	AACTTAAGCA	TATCACTAAG	CGGAGGAAAA
L.vogtianu	TCAGACGTGA	TTACCCGCTG	AACTTAAGCA	TATCACTAAG	CGGAGGAAAA

	1405	1415	1425	1435	1445
L.paradox	GAAACTAACC	AGGATTCCCC	CAGTAACGGC	GAGTGAACGG	GGATTAGCCC
L.vogtianu	GAAACTAACC	AGGATTCCCC	CAGTAACGGC	GAGTGAACGG	GGATTAGCCC

	1455	1465	1475	1485	1495
L.paradox	AGCACCGAAG	CCTGTGACCA	TTTGGTTACT	AGGCAATGTG	GTGTTTAGGT
L.vogtianu	AGCACCGAAG	CCTGTGACCA	TTTGGTTACT	AGGCAATGTG	GTGTTTAGGT

	1505	1515	1525	1535	1545
L.paradox	CAACTTATGG	CATTATTGCT	CTACCCTAAT	TCCAGCAATG	ATTACGGCTT
L.vogtianu	CAACTTATGG	CATTATTGCT	CTACCCTAAG	TCCAGCAATG	AGTACGGCTT

	1555	1565	1575	1585	1595
L.paradox	ACTGGAATGG	CCCATAGAGG	GTGAAAGGCC	CGTAAGGGTA	TAGGCCAAAT
L.vogtianu	ACTGGAATGG	CCCATAGAGG	GTGAAAGGCC	CGTAAGGGTA	GAGGCCAAAT

	1605	1615	1625	1635	1645
L.paradox	GGACAATAAT	GCCCTTAGTA	GACCTTGGAG	TCGGGTTGTT	TGTGAATGCA
L.vogtianu	GGACAATAAT	GCCCTTAGTA	GACCTTGGAG	TCGGGTTGTT	TGTGAATGCA

	1655	1665	1675	1685	1695
L.paradox	GCCCCAAAATG	GGTGGTAAAC	TCCATCTAAG	GCTAAATACT	GACACGAGTC
L.vogtianu	GCCCCAAAATG	GGTGGTAAAC	TCCATCTAAG	GCTAAATACT	GACACGAGTC

	1705	1715	1725	1735	1745
L.paradox	CGATAGCGAA	CAAGTACCGT	GAGGGAAAGT	TGAAAAGTAC	TTTGAAGAGA
L.vogtianu	CGATAGCGAA	CAAGTACCGT	GAGGGAAAGT	TGAAAAGTAC	TTTGAAGAGA

	1755	1765	1775	1785	1795
L.paradox	GGGTAAACAG	TGCGTGAAAC	CGCTTAAAGG	TAAACGGGTG	GAGTTGAACT
L.vogtianu	GGGTAAACAG	TGCGTGAAAC	CGCTTAAAGG	TAAACGGGTG	GAGTTGAACT

	1805	1815	1825	1835	1845
L.paradox	GTAAGCCTTG	GGAATTCAAC	TGGTAAGTAT	TACATGAGCT	TGGGCATTAT
L.vogtianu	GTAAGCCTTG	GGAATTCAAC	TGGTAAGTAT	TACATGAGCT	TGGGCATTAT

	1855	1865	1875	1885	1895
L.paradox	TGGTCGACTT	TTAAAGTCTG	CTTAGTTGCG	GGTCCTTGAC	CTTTATTGGT
L.vogtianu	TGGTCGACTT	TTAAAGTCTG	CTTAGTTGCG	GGTCCTTGAC	CTTTATTGGT

	1905	1915	1925	1935	1945
L.paradox	TAAGGATGTG	CGATGCACTA	TTAAAGTGCT	GTGCACTTTA	AAAGTTGAAG
L.vogtianu	TAAGGATGTG	CGATGCACTA	TTAAAGTGCT	GTGCACTTTA	AAAGTTGAAG

	1955	1965	1975	1985	1995
L.paradox	GCCTGCTTGC	CAGTGCACTT	TCCCTTGGTG	ATCACCACGA	CCGGCGCTGC
L.vogtianu	GCCTGCTTGC	CAGTGCACTT	TCCCTTGGTG	ATCACCACGA	CCGGCGCTGC

	2005	2015	2025	2035	2045
L.paradox	TGTCTGTTTA	CTTTGATCAA	ACCGATTTTG	TCTAACCTTT	ATGATTAGAC
L.vogtianu	TGTCTGTTTA	CTTTGATCAA	ACCGATTTTG	TCTAACCTTT	ATGATTAGAC

	2055	2065	2075	2085	2095
L.paradox	СТААТСГГГА	ТГГСАГГТАГ	СТСАТТГГТТ	ААТТГТТАГС	ТТТТГТТААС
L.vogtianu	СТААТСГГГА	ТГГСАГГТАГ	СТСАТТГГТТ	ААТТГТТАГС	ТТТТГТТААС

	2105	2115	2125	2135	2145
L.paradox	ААТТАТСТТТ	ГГГТГТААТТ	АГСТГГТСАТ	ТГТАААТСТГ	ТГСАГТГСГС
L.vogtianu	ААТТАТСТТТ	ГГГТГТААТТ	АГСТГГТСАТ	ТГТАААТСТГ	ТГСАГТГСГС

	2155	...			
L.paradox	СГГАГАТГАС	ГГС			
L.vogtianu	СГГАГАТГАС	ГГС			

Цветом выделены полиморфизмы.

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 119 – участок 18S.

120 – 812 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

813 – 972 – участок 5.8S.

973 – 1319 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

1320 – 2163 – участок 28S.

**Сравнение нуклеотидных последовательностей рДНК трематод
L. perturbatum и *L. paradoxum***

	5	15	25	35	45
L.paradoxu	TGCGAATGGC	TCATTAAATC	AGCTATGGTT	CCTTAGATCA	TAAATACTAC
L.perturba	TGCGAATGGC	TCATTAAATC	AGCTATGGTT	CCTTAGATCA	TAAATACTAC

	55	65	75	85	95
L.paradoxu	ATGGATAACT	GTAGTAATTC	TAGAGCTAAT	ACATGCCACT	ATGCCCTGAC
L.perturba	ATGGATAACT	GTAGTAATTC	TAGAGCTAAT	ACATGCCACT	ATGCCCTGAC

	105	115	125	135	145
L.paradoxu	CCGCAAGGGA	ATGGGTGGAT	TTATTAGAAC	AGAACCAACC	AGAAATAGTT
L.perturba	CCGCAAGGGA	ATGGGTGGAT	TTATTAGAAC	AGAACCAACC	AGAAATAGTT

	155	165	175	185	195
L.paradoxu	TCGGCTATTT	CTGTTGTAAT	CTGTGATGAC	TCTGGATAAC	TTCCTGATC
L.perturba	TCGGCTATTT	CTGTTGTAAT	CTGTGATGAC	TCTGGATAAC	TTCCTGATC

	205	215	225	235	245
L.paradoxu	GCAAGTCGACC	TTGTGTCGGC	GACGGATCTT	TCAAATATCT	GCCCTATCAA
L.perturba	GCAAGTCGACC	TTGTGTCGGC	GACGGATCTT	TCAAATATCT	GCCCTATCAA

	255	265	275	285	295
L.paradoxu	CTGTTCGATGG	TAGGTGACCT	GCCTACCATG	GTGATAACGG	GTAACGGGGA
L.perturba	CTGTTCGATGG	TAGGTGACCT	GCCTACCATG	GTGATAACGG	GTAACGGGGA

	305	315	325	335	345
L.paradoxu	ATCAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACTTCCA
L.perturba	ATCAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACTTCCA

	355	365	375	385	395
L.paradoxu	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGAA	AATTACCCAC	TCCCGGCACG	GGGAGGTAGT
L.perturba	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGAA	AATTACCCAC	TCCCGGCACG	GGGAGGTAGT

	405	415	425	435	445
L.paradoxu	GACGAAAAAT	ACGAATACGG	GACTCAATTG	AGGCTCCGTA	ATTCTGAATGA
L.perturba	GACGAAAAAT	ACGAATACGG	GACTCAATTG	AGGCTCCGTA	ATTCTGAATGA

	455	465	475	485	495
L.paradoxu	GTACACTTTA	AATCCTTTAA	CGAGGACCAA	TTGGAGGGCA	AGTCTGGTGC
L.perturba	GTACACTTTA	AATCCTTTAA	CGAGGACCAA	TTGGAGGGCA	AGTCTGGTGC

	505	515	525	535	545
L.paradoxu	CAGCAGCCGC	GGTAACTCCA	GCTCCAAAAG	CGTATATTAA	AGTTGCTGCA
L.perturba	CAGCAGCCGC	GGTAACTCCA	GCTCCAAAAG	CGTATATTAA	AGTTGCTGCA

	555	565	575	585	595
L.paradoxu	GTTAAAAAGC	TCGTAGTTGG	ATCTGGGTCG	TGTGGTCACA	TACCGTTGCT
L.perturba	GTTAAAAAGC	TCGTAGTTGG	ATCTGGGTCG	TGTGGTCACA	TACCGTTGCT

	605	615	625	635	645
L.paradoxu	TGTTCTACTA	TCTTGATTAA	AATCGAGACA	GTAGTACGGG	TCGGTGTAGT
L.perturba	TGTTCTACTA	TCTTGATTAA	AATCGAGACA	GTAGTACGGG	TCGGTGTAGT

	655	665	675	685	695
L.paradoxu	GACCGTGCAA	CCTTTCAGTC	GTGTCTGTGT	AAACAGGTGT	TGGTTTAGTT
L.perturba	GACCGTGCAA	CCTTTCAGTC	GTGTCTGTGT	AAACAGGTGT	TGGTTTAGTT

	705	715	725	735	745
L.paradoxu	AATAGGTTTCG	CCCTATTAGC	TTGCTAACAT	GCTTCCGGAT	GCCTTTAAAC
L.perturba	AATAGGTTTCG	CCCTATTAGC	TTGCTAACAT	GCTTCCGGAT	GCCTTTAAAC

	755	765	775	785	795
L.paradoxu	GGGTGTCGGG	GGCAGACGAC	ACTTTTACTT	TGAACAAATT	TGAGTGCTCA
L.perturba	GGGTGTCGGG	GGCAGACGAC	ACTTTTACTT	TGAACAAATT	TGAGTGCTCA

	805	815	825	835	845
L.paradoxu	AAGCAGGCTT	GTATGCCTGA	AAATTCTTGC	ATGGAATAAT	AGAATAGGAC
L.perturba	AAGCAGGCTT	GTATGCCTGA	AAATTCTTGC	ATGGAATAAT	AGAATAGGAC

	855	865	875	885	895
L.paradoxu	TTCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TCTCGGATCC	GAAGTAATGG	TTAAGAGGGA
L.perturba	TTCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TCTCGGATCC	GAAGTAATGG	TTAAGAGGGA

	905	915	925	935	945
L.paradoxu	CAGACGGGGG	CATTTGTATG	GCGGTGTTAG	AGGTGAAATT	CTTGGATCGC
L.perturba	CAGACGGGGG	CATTTGTATG	GCGGTGTTAG	AGGTGAAATT	CTTGGATCGC

	955	965	975	985	995
L.paradoxu	CGCCAGACAA	ACTACAGCGA	AAGCATTTGC	CAAGAATGTT	TTCATTGATC
L.perturba	CGCCAGACAA	ACTACAGCGA	AAGCATTTGC	CAAGAATGTT	TTCATTGATC

	1005	1015	1025	1035	1045
L.paradoxu	AGGAGCGAAA	GTCAGAGGAT	CGAAGACGAT	CAGATACCGT	CCTAGTTCTG
L.perturba	AGGAGCGAAA	GTCAGAGGAT	CGAAGACGAT	CAGATACCGT	CCTAGTTCTG

	1055	1065	1075	1085	1095
L.paradoxu	ACCATAAACG	ATGCCAACTG	ACGATCCGCG	GTGGTCTTTT	AATTGGCTCC
L.perturba	ACCATAAACG	ATGCCAACTG	ACGATCCGCG	GTGGTCTTTT	AATTGGCTCC

	1105	1115	1125	1135	1145
L.paradoxu	GCGGGCAGTC	CCCGGGAAAC	CTTTAAGTCT	TTGGGCTCCG	GGGGAAAGTAT
L.perturba	GCGGGCAGTC	CCCGGGAAAC	CTTTAAGTCT	TTGGGCTCCG	GGGGAAAGTAT

	1155	1165	1175	1185	1195
L.paradoxu	GGTTGCAAAG	CTGAAACTTA	AAGGAATTGA	CGGAAGGGCA	CCACCAGGAG
L.perturba	GGTTGCAAAG	CTGAAACTTA	AAGGAATTGA	CGGAAGGGCA	CCACCAGGAG

	1205	1215	1225	1235	1245
L.paradoxu	TGGAGCCTGC	GGCTTAATTC	GACTCAACAC	GGGAAAACCTC	ACCCGGCCCCG
L.perturba	TGGAGCCTGC	GGCTTAATTC	GACTCAACAC	GGGAAAACCTC	ACCCGGCCCCG

	1255	1265	1275	1285	1295
L.paradoxu	GACTACTGTGA	GGATTGACAG	ATTGATAGCT	CTTTCTTGAT	TCGGTGGTTG
L.perturba	GACTACTGTGA	GGATTGACAG	ATTGATAGCT	CTTTCTTGAT	TCGGTGGTTG

	1305	1315	1325	1335	1345
L.paradoxu	GTGGTGCATG	GCCGTTCTTA	GTTGGTGGAG	CGATTTGTCT	GGTTAATTCC
L.perturba	GTGGTGCATG	GCCGTTCTTA	GTTGGTGGAG	CGATTTGTCT	GGTTAATTCC

	1355	1365	1375	1385	1395
L.paradoxu	GATAACGAAC	GAGACTTTGA	CCTACTAAAT	AGTTCGCCTG	TCCTCTGTGC
L.perturba	GATAACGAAC	GAGACTTTGA	CCTACTAAAT	AGTTCGCCTG	TCCTCTGTGC

	1405	1415	1425	1435	1445
L.paradoxu	TCGTGCAGAT	TGCGGCTTCT	ACTGCCTCTT	CGAGGGGTGA	TAGGGTCGTA
L.perturba	TCGTGCAGAT	TGCGGCTTCT	ACTGCCTCTT	CGAGGGGTGA	TAGGGTCGTA

	1455	1465	1475	1485	1495
L.paradoxu	AATCGACGGG	TACGGTGCAG	GTGTAACTT	CTTAGAGGGA	CAAGCGGCAC
L.perturba	AATCGACGGG	TACGGTGCAG	GTGTAACTT	CTTAGAGGGA	CAAGCGGCAC

	1505	1515	1525	1535	1545
L.paradoxu	ACAAGTCGCA	CGAAATTGAG	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATGT
L.perturba	ACAAGTCGCA	CGAAATTGAG	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATGT

	1555	1565	1575	1585	1595
L.paradoxu	CCGGGGCCGC	ACGTGCGCTA	CAATGACGGT	GTCAGCGAGT	CTGGAAACCT
L.perturba	CCGGGGCCGC	ACGTGCGCTA	CAATGACGGT	GTCAGCGAGT	CTGGAAACCT

	1605	1615	1625	1635	1645
L.paradoxu	GGCCCCAAAG	GGTTGGGTAA	ACTGTTCCAT	CACCGTCGTG	ACTGGGATCG
L.perturba	GGCCCCAAAG	GGTTGGGTAA	ACTGTTCCAT	CACCGTCGTG	ACTGGGATCG

	1655	1665	1675	1685	1695
L.paradoxu	GGGCTTGCAA	TTATTCCCCG	TGAACGAGGA	ATTCCCTGGTA	AGTGCAAGTC
L.perturba	GGGCTTGCAA	TTATTCCCCG	TGAACGAGGA	ATTCCCTGGTA	AGTGCAAGTC

	1705	1715	1725	1735	1745
L.paradoxu	ATAAGCTTGC	GCTGATTACG	TCCCTGCCCT	TTGTACACAC	CGCCCCGTCGC
L.perturba	ATAAGCTTGC	GCTGATTACG	TCCCTGCCCT	TTGTACACAC	CGCCCCGTCGC

	1755	1765	1775	1785	1795
L.paradoxu	TACTACCGAT	TGAATGGTTT	AGCAAGGTCC	TCGGATTGGT	GATGTTGTAG
L.perturba	TACTACCGAT	TGAATGGTTT	AGCAAGGTCC	TCGGATTGGT	GATGTTGTAG

	1805	1815	1825	1835	1845
L.paradoxu	TGACTTTTGT	CACATGAACT	GTGCCAAGAA	GACGACCGAA	CTTGATCATT
L.perturba	TGACTTTTGT	CACATGAACT	GTGCCAAGAA	GACGACCGAA	CTTGATCATT

	1855	1865	1875	1885	1895
L.paradoxu	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG
L.perturba	TAGAGGAAGT	AAAAGTCGTA	ACAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG

	1905	1915	1925	1935	1945
L.paradoxu	GATCATTACA	AATCCCTAAT	TATTAAACCA	TTATTATCAT	ACATATGTGC
L.perturba	GATCATTACA	AATCCCTAAT	TATTAAACCA	TTATTATCAT	ACATATGTGC

	1955	1965	1975	1985	1995
L.paradoxu	ATGTGTGCAT	GTATGTATGT	ATAAAAAGTCT	ACTTGATGTT	TGGTATTTAA
L.perturba	ATGTGTGCAT	GTATGTATGT	ATAAAAAGTCT	ACTTGATGTT	TGGTATTTAA

	2005	2015	2025	2035	2045
L.paradoxu	AAGTAACTAA	ACATTAAAAG	ACTATAAATT	TATATGTAAA	CAATATTAAT
L.perturba	AAGTAACTAA	ACATTAAAAG	ACTATAAATT	TATATGTAAA	CAATATTAAT

	2055	2065	2075	2085	2095
L.paradoxu	ATTTATTAAA	AGAAATTGAC	GGATGGATTT	TATGGATCCG	CGGCTTAGGG
L.perturba	ATTTATTAAA	AGAAATTGAC	GGATGGATTT	TATGGATCCG	CGGCTTAGGG

	2105	2115	2125	2135	2145
L.paradoxu	CTATGCCTAT	CAATTTAAAT	TTGTTATGCA	TAGTGCCTGT	GTTAGACGAG
L.perturba	CTATGCCTAT	CAATTTAAAT	TTGTTATGCA	TAGTGCCTGT	GTTAGACGAG

	2155	2165	2175	2185	2195
L.paradoxu	GTGTCTAACC	TGTCAGATGC	TCTG-TGTGT	AAGTTCAGCG	GGTAATCCCA
L.perturba	GTGTCTAACC	TGTCAGATGC	TCTGATG-GT	ATGCTC-GTA	GATTAT--TA

	2205	2215	2225	2235	2245
L.paradoxu	CCAGATGTTG	CTATCCTACT	AATCTACCAG	TCATGCTTAG	AGCGACAGGA
L.perturba	TTA-TTATTA	TTATTATAGT	AAACTACCAG	TCATGCTTGG	AGCGACAGGA

	2255	2265	2275	2285	2295
L.paradoxu	TAGTACTGTG	TACAACACTG	TGCTAGGCTC	AAAGAGGAGT	GCAGGACTAC
L.perturba	TAGTACTGTG	TACAACACTG	TGCTAGGCTC	AAAGAGGAGT	GCAGGACTAC

	2305	2315	2325	2335	2345
L.paradoxu	GGACCGGCTC	CCGCCTCATT	TGTTGTTAAT	TTAATTACTA	TTATTACACT
L.perturba	GGACCGGCTC	CCGCCTCATT	TGTTGTTAAT	TTAATTACTA	TTATTACACT

	2355	2365	2375	2385	2395
L.paradoxu	GTTTAAAGCTA	ACTAAATTAG	ATTTAATTCT	GATTTTGTTA	GTTGAATAAT
L.perturba	GTTTAAAGCTA	ACTAAATTAG	ATTTAATTCT	GATTTTGTTA	GTTGACTTAT

	2405	2415	2425	2435	2445
L.paradoxu	GGCATGCACC	TGATTGCTAG	TCAATTGGAC	TGCATGTGAC	GATCGCCTAG
L.perturba	GGCATGCACC	TGATTGCTAG	TCAATTGGAC	TGCATGTGAC	GATCGCCTAG

	2455	2465	2475	2485	2495
L.paradoxu	CGGTGCCTTA	TCCTAGGCTC	GATCGGTAAA	TCGAAATGTT	TGTTTTTCATT
L.perturba	CGGTGCCTTA	TCCTAGGCTC	GATCGGTAAA	TCGAAATGTT	TGTTTTTCATT

	2505	2515	2525	2535	2545
L.paradoxu	AA---T---TT	AATGAAACAA	ATATTGTACA	ACTTTAAGCG	GTGGATCACT
L.perturba	AATTTTCATT	AATGAAACAA	ATATTGTACA	ACTTTAAGCG	GTGGATCACT

	2555	2565	2575	2585	2595
L.paradoxu	CGGCTCGTGT	GTCGATGAAG	AGTGCAGCCA	ACTGTGTGAA	TTAATGTGAA
L.perturba	CGGCTCGTGT	GTCGATGAAG	AGTGCAGCCA	ACTGTGTGAA	TTAATGTGAA

	2605	2615	2625	2635	2645
L.paradoxu	CTGCATACTG	CTTTGAACAT	CGACCTCTTG	AACGCATATT	GCGGCCACGG
L.perturba	CTGCATACTG	CTTTGAACAT	CGACCTCTTG	AACGCATATT	GCGGCCACGG

	2655	2665	2675	2685	2695
L.paradoxu	GATATCCTGT	GGCCACGCCT	GGCCGAGGGT	CGGCTTATAA	ACTATCACGA
L.perturba	GATATCCTGT	GGCCACGCCT	GGCCGAGGGT	CGGCTTATAA	ACTATCACGA

	2705	2715	2725	2735	2745
L.paradoxu	TGCCCAAAA	GTCGTGGATT	GGATGCTGTG	CCAGCTGGCA	TGATTTCCCTT
L.perturba	TGCCCAAAA	GTCGTGGATT	GGATGCTGTG	CCAGCTGGCA	TGATTTCCCTC

	2755	2765	2775	2785	2795
L.paradoxu	AATGTAGTA-	-T---TTAATA	TACATACATA	TGAGGTGCCA	GATCTATGGC
L.perturba	AATGTAGTAT	TTAA--TTAATA	TACTAACATA	TGAGGTGCCA	GATCTATGGC

	2805	2815	2825	2835	2845
L.paradoxu	TCCGTCCTAA	TGTATCCGGT	TACAGCCAAG	TCTATATTTA	TTATAATATT
L.perturba	TCCA--TCCTAA	TGTATCCGGT	TACAGCCAAG	TCTATATTTA	TTAT--TATT

	2855	2865	2875	2885	2895
L.paradoxu	AAATG---AA	ATTGCTGTGA-	-A--TGGATTA	TGCTCAGGTC	GTGGCTCAAT
L.perturba	AAATGATAAA	ATTGCTGTAT	TACTGGATTA	TGCTCAGGTC	GTGGCTCAAT

	2905	2915	2925	2935	2945
L.paradoxu	GATTTTGAAC	ACGCTTGATG	TTATAAT--T	TATA--T--A--T	ATATAAATAT
L.perturba	GATTTTGAAC	ACGCTTGATG	TTATAATCCA	TATA--TAAAT	ATATAAATAT

	2955	2965	2975	2985	2995
L.paradoxu	AGACATTGGA	TTATTTTGTGTA	GCCGAGGGAG	TGTAAATACT	CTATAATTTG
L.perturba	AGACATTGGA	TTATTTTGTGTA	GCCGATGGAG	TGTAAATACT	CTATAATATG

	3005	3015	3025	3035	3045
L.paradoxu	GGTAATTTAT	TGATTTTATAT	GATACCCTAA	TTATATATAT	TATGACCCTG
L.perturba	GGTAATTTAT	TGATTTTATAT	GATACCCTAA	TTATATATAT	TATGACCCTG

	3055	3065	3075	3085	3095
L.paradoxu	ACCTCGGATC	AGACGTGATT	ACCCGCTGAA	CTTAAGCATA	TCACTAAGCG
L.perturba	ACCTCGGATC	AGACGTGATT	ACCCGCTGAA	CTTAAGCATA	TCACTAAGCG

	3105	3115	3125	3135	3145
L.paradoxu	GAGGAAAAGA	AACTAACCAG	GATTCCCCCA	GTAACGGCGA	GTGAACGGGG
L.perturba	GAGGAAAAGA	AACTAACCAG	GATTCCCCCA	GTAACGGCGA	GTGAACGGGG

	3155	3165	3175	3185	3195
L.paradoxu	ATTAGCCAG	CACCGAAGCC	TGTGACCATT	TGGTTACTAG	GCAATGTGGT
L.perturba	ATTAGCCAG	CACCGAAGCC	TGTGACCATT	TGGTTACTAG	GCAATGTGGT

	3205	3215	3225	3235	3245
L.paradoxu	GTTTAGGTCA	ACTTATGGCA	TTATTGCTCT	ACCCTAAGTC	CAGCAATGAG
L.perturba	GTTTAGGTCA	ACTTATGGCA	TTATTGCTCT	ACCCTAAGTC	CAGCAATGAG

	3255	3265	3275	3285	3295
L.paradoxu	TACGGCTTAC	TGGAATGGCC	CATAGAGGGT	GAAAGGCCCG	TAAGGGTAGA
L.perturba	TACGGCTTAC	TGGAATGGCC	CATAGAGGGT	GAAAGGCCCG	TAAGGGTAGA

	3305	3315	3325	3335	3345
L.paradoxu	GACCAAATGG	ACAATAATGC	CCTTAGTAGA	CCTTGGAGTC	GGGTTGTTTG
L.perturba	GACCAAATGG	ACAATAATGC	CCTTAGTAGA	CCTTGGAGTC	GGGTTGTTTG

	3355	3365	3375	3385	3395
L.paradoxu	TGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTC	CATCTAAGGC	TAAATACTGA
L.perturba	TGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTC	CATCTAAGGC	TAAATACTGA

	3405	3415	3425	3435	3445
L.paradoxu	CACGAGTCCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGGAAAAGTTG	AAAAGTACTT
L.perturba	CACGAGTCCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGGAAAAGTTG	AAAAGTACTT

	3455	3465	3475	3485	3495
L.paradoxu	TGAAGAGAGG	GTAAACAGTG	CGTGAAACCG	CTTAAAGGTA	AACGGGTGGA
L.perturba	TGAAGAGAGG	GTAAACAGTG	CGTGAAACCG	CTTAAAGGTA	AACGGGTGGA

	3505	3515	3525	3535	3545
L.paradoxu	GTTGAACTGT	AAGCCTTGGG	AATTCAACTG	GTAAGTATTA	CATGAGCTTG
L.perturba	GTTGAACTGT	AAGCCTTGGG	AATTCAACTG	GTAAGTATTA	CATGAGCTTG

	3555	3565	3575	3585	3595
L.paradoxu	GGCATTATTG	GTCGACTTTT	AAAGTCTGCT	TAGTTGCGGG	TCCTTGACCT
L.perturba	GGCATTATTG	GTCGACTTTT	AAAGTCTGCT	TAGTTGCGGG	TCCTTGACCT

	3605	3615	3625	3635	3645
L.paradoxu	TTATTGGTTA	AGGATGTGCG	ATGCACTATT	AAAGTGCTGT	GCACTTTAAA
L.perturba	TTATTGGTTA	AGGATGTGCG	ATGCACTATT	AAAGTGCTGT	GCACTTTAAA

	3655	3665	3675	3685	3695
L.paradoxu	AGTTGAAGGC	CTGCTTGCCA	GTGCACTTTC	CCTTGGTGAT	CACCACGACC
L.perturba	AGTTGAAGGC	CTGCTTGCCA	GTGCACTTTC	CCTTGGTGAT	CACCACGACC

	3705	3715	3725	3735	3745
L.paradoxu	GGCGCTGCTG	TCTGTTTACT	TTGATCAAAC	CGATTTTGTC	TAACCTTTAT
L.perturba	GGCGCTGCTG	TCTGTTTACT	TTGATCAAAC	CGATTTTGTC	TAACCTTTAT

	3755	3765	3775	3785	3795
L.paradoxu	GATTAGACCT	AATCGGGATG	GCAGGTAGCT	CATTGGTTAA	TTGTTAGCTT
L.perturba	GATTAGACCT	AATCGGGATG	GCAGGTAGCT	CATTGGTTAA	TTGTTAGCTT

	3805	3815	3825	3835	3845
L.paradoxu	TTGTTAACAA	TTATCTTTGG	GTGTAATCAG	CTGATCATTG	TAAATCTGTG
L.perturba	TTGTTAACAA	TTATCTTTGG	GTGTAATCAG	CTGATCATTG	TAAATCTGTG

	3855	3865	3875	3885	3895
L.paradoxu	CAGTGCGCCG	GAGATGACGG	CTATGGTGTG	TGCATACGTG	CTTTGCTAAT
L.perturba	CAGTGCGCCG	GAGATGACGG	CTATGGTGTG	TGCATACGTG	CTTTGCTAAT

	3905	3915	3925	3935	3945
L.paradoxu	TGATGTTGCT	TAGTCTGATC	GGATTTGTTT	ACTCACTTTT	GTGGGTCTGC
L.perturba	TGATGTTGCT	TAGTCTGATC	GGATTTGTTT	ACTCACTTTT	GTGGGTCTGC

	3955	3965	3975	3985	3995
L.paradoxu	TGATGGCTAA	GCTTCGTTTCG	ATTATCGGTA	GCGTATGTGA	CACTAAATTG
L.perturba	TGATGGCTAA	GCTTCGTTTCG	ATTATCGGTA	GCGTATGTGA	CACTAAATTG

	4005	4015	4025	4035	4045
L.paradoxu	GGCCAATAGT	CTGTGGTGTT	GCGGTAGACG	ATCCACCTGA	CCCCTCTTGA
L.perturba	GGCCAATAGT	CTGTGGTGTT	GCGGTAGACG	ATCCACCTGA	CCCCTCTTGA

	4055	4065	4075	4085	4095
L.paradoxu	AACACGGACC	AAGGAGTTTA	ACATGTGCGC	GAGTCATTGG	GCGTTACGAA
L.perturba	AACACGGACC	AAGGAGTTTA	ACATGTGCGC	GAGTCATTGG	GCGTTACGAA

	4105	4115	4125	4135	4145
L.paradoxu	ACCCAAAGGC	GTAGTGAAAG	TAAAGGCTTA	GCTTGTCTAA	GCTGTGGTGA
L.perturba	ACCCAAAGGC	GTAGTGAAAG	TAAAGGCTTA	GCTTGTCTAA	GCTGTGGTGA

	4155	4165	4175	4185	4195
L.paradoxu	GATCCTGCCG	TTTCTCGTGC	CTGGTACCAC	CAAGCGTTTG	AGCGGTAGGC
L.perturba	GATCCTGCCG	TTTCTCGTGC	CTGGTACCAC	CAAGCGTTTG	AGCGGTAGGC

	4205	4215	4225	4235	4245
L.paradoxu	GCATCACCAG	CCCGTCTCAT	GGTGTAGTCA	TGTAACCTGT	TATATGCATC
L.perturba	GCATCACCAG	CCCGTCTCAT	GGTGTAGTCA	TGTAACCTGT	TATATGCATC

	4255	4265	4275	4285	4295
L.paradoxu	ACCGGGGCGG	AGCTTGAGCG	TACACGTTGA	GACCCGAAAAG	ATGGTGAAGT
L.perturba	ACCGGGGCGG	AGCTTGAGCG	TACACGTTGA	GACCCGAAAAG	ATGGTGAAGT

	4305	4315	4325	4335	4345
L.paradoxu	ATGCTTGCGC	AGGTTGAAGC	CAGAGGAAAC	TCTGGTGGAG	GACCGTAGCG
L.perturba	ATGCTTGCGC	AGGTTGAAGC	CAGAGGAAAC	TCTGGTGGAG	GACCGTAGCG

	4355	4365	4375	4385	4395
L.paradoxu	ATTCTGACGT	GCAAATCGAT	CGTCTAACGT	GAGTATAGGG	GCGAAAAGACT
L.perturba	ATTCTGACGT	GCAAATCGAT	CGTCTAACGT	GAGTATAGGG	GCGAAAAGACT

	4405	4415	4425	4435	4445
L.paradoxu	AATCGAACCA	TCTAGTAGCT	GGTTCCCTCC	GAAGTTTCCC	TCAG
L.perturba	AATCGAACCA	TCTAGTAGCT	GGTTCCCTCC	GAAGTTTCCC	TCAG

Цветом выделены полиморфизмы.

Цифрами обозначены позиции нуклеотидов в последовательности.

1 – 1837 – участок 18S.

1838 – 2521 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS1.

2522 – 2681 – участок 5.8S.

2682 – 3039 – внутренний транскрибируемый спейсер ITS2.

3040 – 4444 – участок 28S.