

УДК 576.895(262.5):[575.22:576.311.47]

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЧЕРНОМОРСКИХ ТРЕМАТОД СЕМЕЙСТВА ОРЕСОЕЛИДАЕ ПО МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ МАРКЕРАМ

© 2020 г. А. В. Катохин¹, Ю. М. Корнийчук²¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация²Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, Российская ФедерацияE-mail: katokhin@bionet.nsc.ruПоступила в редакцию 01.08.2020; после доработки 18.12.2020;
принята к публикации 25.12.2020; опубликована онлайн 30.12.2020.

Opaeoeelidae Ozaki, 1925 (Trematoda: Opaeoeeloidea) — ведущее по числу видов и родов семейство трематод в Чёрном море. Мариты наиболее распространённых видов черноморских опецелидных трематод подробно описаны морфологически, однако сведения о структуре их геномов отрывочны, а данные о митохондриальных геномах отсутствуют полностью. Цель исследования — получить первые сведения о строении участков митохондриального генома представителей наиболее распространённых в Чёрном море в современный период родов трематод семейства Opaeoeelidae для последующего уточнения их таксономического статуса. Филогенетические отношения внутри анализируемой части этого семейства реконструированы на основе данных, полученных нами, и соответствующих данных из GenBank с помощью алгоритма Maximum Likelihood и модели нуклеотидных замен НКУ. Для укоренения филогенетического дерева использованы соответствующие последовательности *Brachycladium goliath* (Brachycladioidea: Brachycladiidae). Поскольку последовательности CO1 — стандартного и наиболее популярного митохондриального маркера — для исследуемых родов опецелид до сих пор не были известны, нами на основе известных соответствующих последовательностей Xiphidiata разработаны праймеры для амплификации фрагмента CO1, чтобы впервые провести соответствующий филогенетический анализ. Впервые определены и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриальных генов CO1 и 16S черноморских трематод *Cainocreadium flesi* Korniychuk & Gaevskaya, 2000, *Gaevskajatrema perezi* (Mathias, 1926) Gibson & Bray, 1982 и *Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1902 от разных видов дефинитивных хозяев — рыб. У *C. flesi* не выявлено специфичных к окончательным хозяевам — рыбам линий по структуре фрагмента митохондриального гена CO1, однако отмечено высокое CO1-нуклеотидное разнообразие. У марит черноморских *H. fasciata* определена приуроченная к зеленушкам-руленам *Symphodus tinca* CO1-гаплогруппа, статус которой требует дальнейшего выяснения; необходимы экологические и генетические исследования предполагаемого видового комплекса *H. fasciata* из разных акваторий. При анализе последовательностей фрагмента митохондриального гена 16S рРНК гостальных генетических линий у *H. fasciata* выделить не удалось. У черноморских *G. perezi* не обнаружено значительных различий по фрагменту 16S между трематодами из окончательных хозяев разных видов, однако внутривидовое 16S-нуклеотидное разнообразие оказалось высоким.

Ключевые слова: Чёрное море, Trematoda, Opaeoeelidae, *Cainocreadium*, *Gaevskajatrema*, *Helicometra*, митохондриальные гены, CO1, 16S рРНК

Ведущим по числу родов и видов семейством трематод Чёрного моря является Оресоелидае Ozaki, 1925 (Trematoda: Oresoeleidae) (Гаевская и Корнийчук, 2003). Примерно за последние 50 лет оно испытало прогрессирующее уменьшение представленности видов и родов в этом водоёме (Дмитриева и др., 2018), причины которого полностью не ясны. Мариты наиболее распространённых в современный период в Чёрном море видов опецелид (*Cainocreadium flesi* Korniyuchuk & Gaevskaya, 2000, *Gaevskajatrema perezii* (Mathias, 1926) Gibson & Bray, 1982 и *Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1902) подробно описаны только морфологически, с использованием методов световой микроскопии (Гаевская и Солонченко, 1989 ; Корнийчук, 2009 ; Корнийчук и Гаевская, 2000 ; *Определитель паразитов позвоночных...*, 1975). Имеющиеся ныне сведения о структуре геномов видов опецелид (и вообще трематод), известных из Чёрного моря, представлены главным образом данными о нуклеотидных последовательностях фрагментов ядерной ДНК (18S рДНК, 28S рДНК, ITS1, ITS2) (Катохин и Корнийчук, 2018 ; Andres et al., 2014 ; Born-Torrijos et al., 2012 ; Bray et al., 2016 ; Jousson & Bartoli, 2001). Немногочисленные сведения о структуре митохондриальных генов опецелид, принадлежащих к представленным в Чёрном море родам этого семейства, получены только на тихоокеанском материале (Donald et al., 2004 ; Donald & Spencer, 2016 ; González et al., 2013 ; Lagrue, 2016 ; López et al., 2015 ; Martin et al., 2019 ; Yano & Urabe, 2017) и малопригодны для подтверждения видовой идентификации черноморских трематод молекулярно-генетическими методами.

Цель исследования — получить первые данные о строении участков митохондриального генома представителей наиболее распространённых в Чёрном море в современный период родов трематод семейства Оресоелидае Ozaki, 1925 (*C. flesi*, *G. perezii* и *H. fasciata*) для последующего уточнения их таксономического статуса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мариты трематод *Cainocreadium flesi*, *Gaevskajatrema perezii* и *Helicometra fasciata* из семейства Оресоелидае Ozaki, 1925 получены от черноморских рыб, выловленных в районе г. Севастополя и урочища Батилиман, а также в акватории Карадагского природного заповедника (табл. 1). Их видовая принадлежность определена по общепринятым морфологическим критериям (Гаевская и Солонченко, 1989 ; Корнийчук, 2009 ; Корнийчук и Гаевская, 2000 ; *Определитель паразитов позвоночных...*, 1975).

Для молекулярно-генетического анализа выбраны фрагменты митохондриальных генов трематод, кодирующих рибосомную РНК 16S и первую субъединицу цитохром с-оксидазы (CO1). Выделение тотальной ДНК проводили по методу с применением ЦТАБ (Wilke et al., 2006). Для амплификации фрагмента 16S рРНК размером 257 нуклеотидов использовали праймеры OMP38 5'-AGACGGAAAGACCCCGAG-3' и OMP04 5'-CTCACGCCGGTCTTAАСТ-3' и следующий термопрофиль полимеразной цепной реакции: денатурация при +94 °С 3 минуты, 40 циклов (денатурация при +94 °С 20 секунд; отжиг праймеров при +52 °С 30 секунд; синтез при +72 °С 25 секунд). Эти праймеры были разработаны и использованы для реконструкции митогеномов описторхидных трематод (Shekhovtsov et al., 2010) и оказались пригодными также для генотипирования опецелид. Применяли стандартные условия реакции (см. http://molbiol.ru/protocol/12_01.html).

Для амплификации фрагмента гена CO1 размером 276 нуклеотидов использовали праймеры PlagiHenC1F 5'-GTTGTTTGGGCTCATCATATGTTTA-3' и OpeCo1uniR2 5'-AGCCACCACAААССААGТATCATG-3' и описанный выше термопрофиль полимеразной цепной реакции, но с температурой отжига праймеров +54 °С. До нашей работы последовательности CO1 для трематод рода *Cainocreadium* не были известны, поэтому при разработке праймера PlagiHenC1F за основу был взят праймер, ранее предложенный для трематод

семейства Prosthogonimidae (Heneberg et al., 2015); он после выравнивания с представленными в GenBank (NCBI) последовательностями был модифицирован, чтобы стать пригодным для генотипирования видов семейства Opescoelidae. При разработке праймера OpCo1uniR2 за основу был взят праймер, созданный и применённый для генотипирования описторхид; он аналогично был модифицирован для работы с ДНК опецелидных трематод (рис. 1).

Таблица 1. Проанализированные образцы мари́т опецелидных трематод

Table 1. Trematoda (Opescoelidae) maritae samples, analyzed in the study

Идентификатор образца	Вид трематоды	Вид рыбы-хозяина	Регион сбора	№ в GenBank		
				16S	CO1	
009Cai-PfSKr05-21	<i>Cainocreadium flesi</i>	<i>Platichthys flesus</i>	Севастополь	MT472528	MT472167	
010Cai-PfSKr05-22				MT472529	MT472168	
022Cai-PfSKr05-23				MT472530	MT472169	
001Cai-GmSKr05-21		Севастополь			MT472531	–
002Cai-GmSKr05-22					MT472532	–
003Cai-GmSKr05-23					MT472533	MT472170
004Cai-GmSKr05-24					MT472534	–
011Cai-GmKkr18-21			<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Карадаг	MT472535	MT472171
012Cai-GmKkr18-22					MT472536	–
013Cai-GmKkr18-23					MT472537	MT472172
014Cai-GmKkr18-24					MT472538	MT472173
018Cai-GmKkr18-26					MT472539	–
019Cai-GmKkr18-27					MT472540	–
005Hel-SpSKr05-21	<i>Helicometra fasciata</i>	<i>Salaria pavo</i>	Севастополь	–	MT472174	
006Hel-SpSKr05-22				MT472542	MT472175	
015Hel-GmBkr17-22		<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	Батилиман	MT472543	MT472176	
042Hel-GmKkr18-21			Карадаг	MT472548	–	
043Hel-GmKkr18-22				MT472549	–	
047Hel-GmKkr18-23		MT472551		MT472177		
048Hel-GmKkr18-24		MT472552	–			
036Hel-AsKkr18-21		<i>Aidablennius sphyinx</i>	Севастополь	MT472545	–	
037Hel-AsKkr18-22				MT472546	–	
040Hel-AsKkr18-25				MT472547	–	
049Hel-SpKkr06-21		<i>Scorpaena porcus</i>	Карадаг	MT472553	MT472178	
045Hel-SrBkr02-21		<i>Symphodus roissali</i>	Севастополь	MT472550	–	
056Hel-StSKr19-22		<i>Symphodus tinca</i>	Севастополь	MT472554	MT472179	
057Hel-StSKr19-23				MT472556	–	
041Gae-SsSKr19-21		<i>Gaevskajatrema perezi</i>	<i>Symphodus ocellatus</i>	Севастополь	MT472557	–
051Gae-SoSKr19-22	MT472558				–	
052Gae-StSKr19-23	<i>Symphodus tinca</i>		Севастополь	MT472559	–	
053Gae-StSKr19-24				MT472556	–	
–	<i>Helicometra fasciata</i>	<i>Labrisomus philippii</i>	Тихий океан, побережье Чили	–	KJ996004 [20]	
–	<i>Helicometra fasciata</i>	<i>Paralabrax humeralis</i>	Тихий океан, побережье Чили	–	KJ996005; KJ996006 [20]	
–	<i>Brachycladium goliath</i>	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Атлантический океан	KR703278	KR703278 [17]	

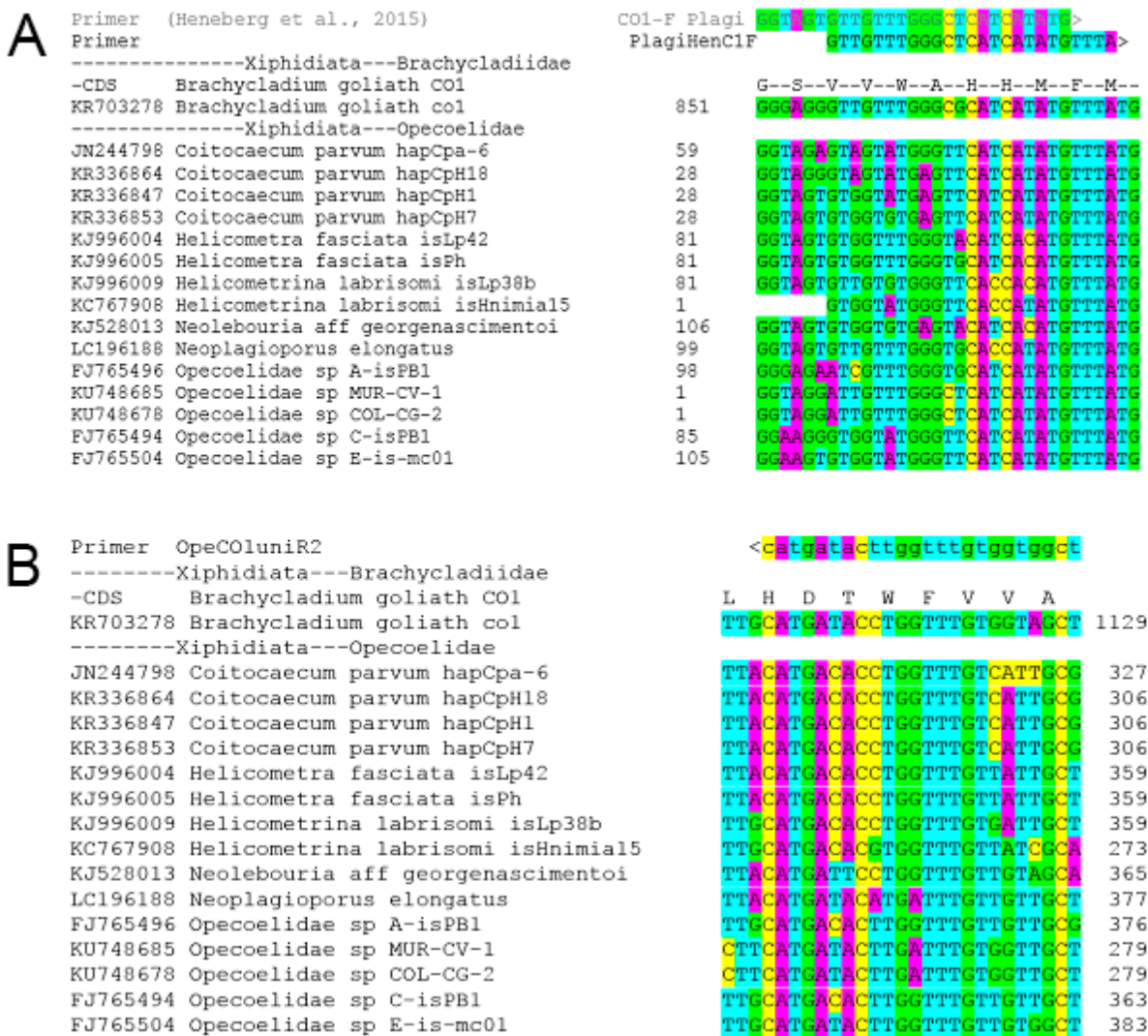


Рис. 1. Выравнивание фрагментов гена CO1 опецелид и *Brachycladium goliath* и положение праймеров PlagiHenC1F (A) и OpeCOLuniR2 (B)

Fig. 1. Alignment of CO1 gene fragments of Opecoelidae trematodes and *Brachycladium goliath*; position of PlagiHenC1F (A) and OpeCOLuniR2 (B) primers

Последовательность ампликонов расшифровывали по методу Сэнгера. Анализ продуктов реакций секвенирования после очистки с помощью осаждения изопропанолом проводили в центре секвенирования Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН на капиллярном секвенаторе ABI 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Полученные последовательности выравнивали алгоритмом Clustal W; расчёт генетических дистанций и анализ множественных выравниваний проводили с помощью программы MEGA X (Kumar, 2018).

Нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриальных генов CO1 и 16S черноморских трематод, определённые в этой работе, депонированы в GenBank (см. табл. 1). Для филогенетического анализа использовали соответствующие 16S- и CO1-последовательности опецелид из GenBank (табл. 1). Для *Gaevskajatrema perezi* фрагмент CO1 амплифицировать не удалось; одна из возможных причин этой неудачи — чрезмерный полиморфизм в участках дуплексообразования матрицы с праймерами. Филогенетические отношения внутри анализируемой части семейства Opecoelidae реконструированы на основе данных, полученных нами, и соответствующих

данных из GenBank с помощью алгоритма максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и модели нуклеотидных замен НКУ, рекомендованной подпрограммой Model Test из пакета MEGA X. Для укоренения филогенетического дерева использовали соответствующие последовательности трематоды *Brachycladium goliath* (van Beneden, 1858) Fraija-Fernández, Aznar, Raga, Gibson & Fernández, 2014 (Brachycladiidae) — вида из близкородственного надсемейства Brachycladioidea.

Гаплотипы выявляли и анализировали с помощью программы DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Сети гаплотипов строили с помощью программы Network 10 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt et al., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генетических дистанций между черноморскими представителями опецелидных трематод из разных родов по последовательностям фрагментов митохондриальных генов 16S и CO1 выявил существенные количественные различия между ними при гораздо более низкой внутривидовой изменчивости соответствующих участков генома трематод (табл. 2).

Таблица 2. Генетические дистанции по последовательностям фрагментов митохондриальных генов CO1 (над диагональю) и 16S (под диагональю) внутри видов (в скобках, жирным шрифтом) и между видами изученных черноморских опецелидных трематод

Table 2. Estimates of genetic distances (number of base substitutions per site) intra- (in brackets, bold) and between studied Black Sea Opascoelidae trematodes for CO1 (above diagonal) and 16S mitochondrial genes fragments (below diagonal)

	CO1	<i>Cainocreadium flesi</i> (0,2175)	<i>Helicometra fasciata</i> (0,0423)
16S			
<i>Cainocreadium flesi</i> (0,0031)			0,3108
<i>Helicometra fasciata</i> (0,0109)		0,0719	
<i>Gaevskajatrema perezii</i> (0,0127)		0,0688	0,0616

Положение изученных видов черноморских опецелидных трематод на филогенетическом дереве на основе изучаемого фрагмента 16S рРНК (рис. 2) адекватно отразило распределение видов трематод по родам.

Cainocreadium flesi Korniyuchuk & Gaevskaya, 2000. Митохондриальный ген 16S используют, как правило, для различения таксонов трематод выше видового уровня (наиболее надёжно — для различения семейств) (Blasco-Costa et al., 2016), и на внутривидовом уровне маловероятны какие-либо существенные отличия в его нуклеотидных последовательностях. Тем не менее у трематод рода *Cainocreadium* выявлено шесть 16S-гаплотипов, переходы между которыми наглядно иллюстрирует рис. 3. Проанализированные образцы от камбалы глоссы *P. flesus* представлены тремя гаплотипами (№ 4–6), различающимися одной нуклеотидной заменой и/или инсерцией-делецией. Все проанализированные образцы марины *Cainocreadium* от морского налима *G. mediterraneus* представлены тремя другими гаплотипами (№ 1–3), с разницей в одну нуклеотидную замену между ними. При этом наиболее распространённым является гаплотип № 1: он был определён у особей *Cainocreadium*, собранных в разные годы, в различных акваториях и от разных экземпляров рыб-хозяев. Гостальная приуроченность гаплогрупп гена 16S свидетельствует о некоторой разнонаправленности микроэволюционных процессов в отношении него в парагемипопуляциях марины черноморских *Cainocreadium*, формирующихся в морских налимах и в камбалах глоссах.

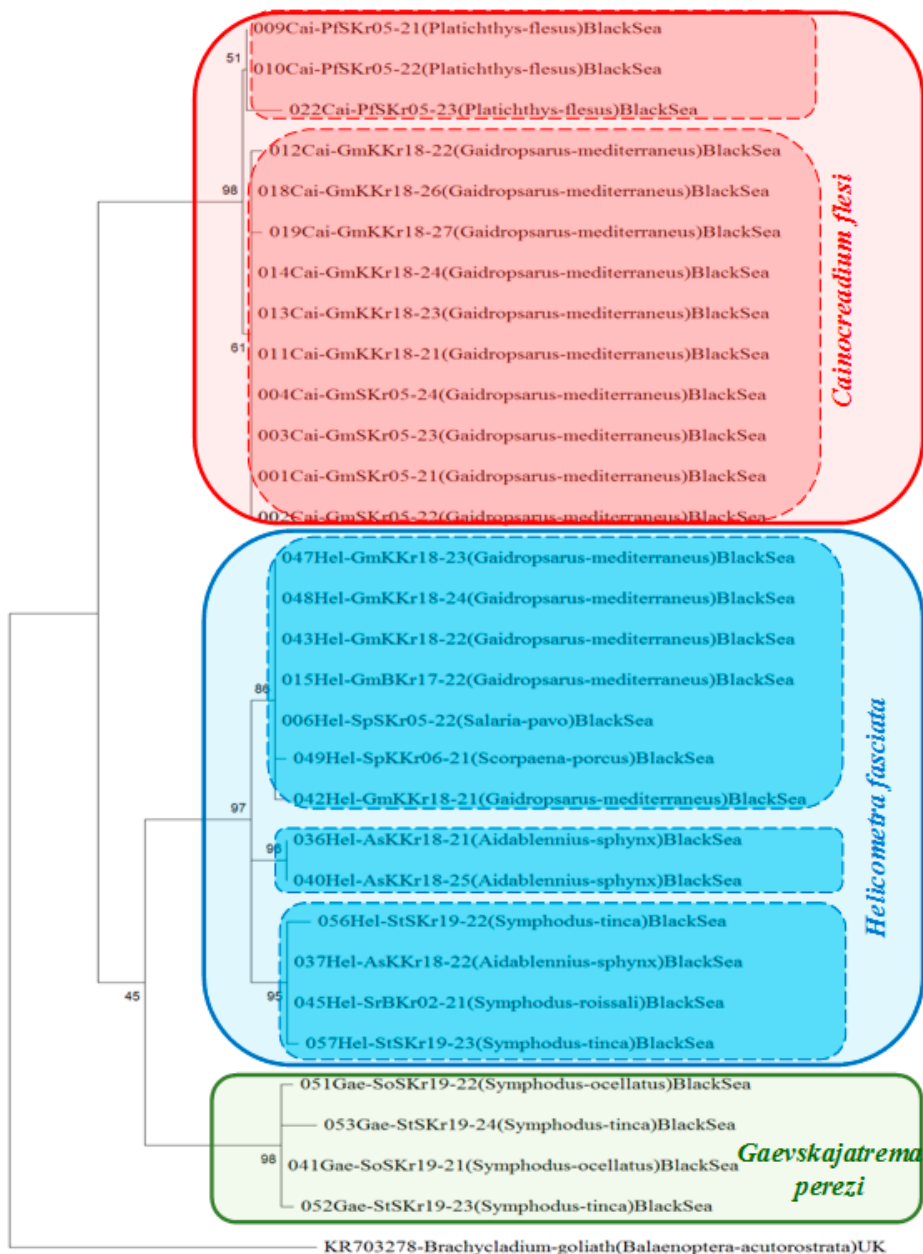


Рис. 2. ML-филограмма сходства черноморских трематод семейства Opencolidae по фрагменту митохондриального гена 16S рРНК

Fig. 2. ML phylogram of Black Sea Opencolidae trematodes, based on 16S rRNA mitochondrial gene fragment

Анализ сходства-различия трематод *C. flesi* от разных хозяев по структуре фрагмента митохондриального гена CO1 (рис. 4) не выявил гостально специфичных кластеров, что согласуется с ранее полученными данными об отсутствии генетической изменчивости этих трематод от налима и глоссы по нуклеотидным последовательностям ITS1 (Катохин и Корнийчук, 2018) и, видимо, может свидетельствовать в пользу принадлежности черноморских марит *Cainocreadium* от разных окончательных хозяев — рыб, имеющих тем не менее выраженные морфологические различия (Корнийчук, 2008), к одному и тому же виду, *C. flesi*. Между тем у проанализированных образцов *C. flesi* отмечено очень высокое CO1-гаплотипическое разнообразие (рис. 4): каждый из них относился к отдельному гаплотипу; выявлено 14 несинонимичных замен (0,21 %) и 28 синонимичных (0,42 %).

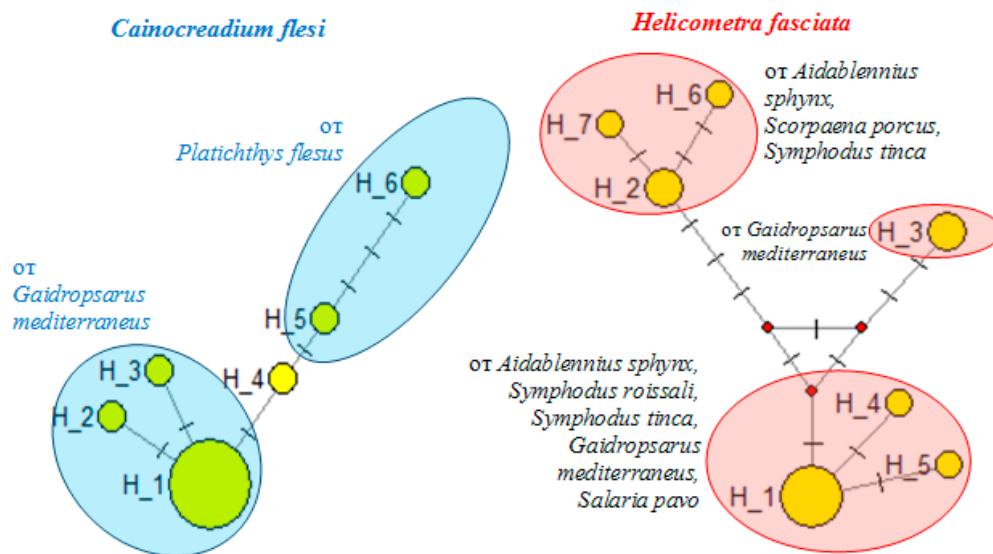


Рис. 3. Сети 16S-гаплотипов двух видов черноморских трематод

Fig. 3. Haplotype networks of 16S of two Black Sea trematodes

Анализ с помощью программы Network 10 показал, что CO1-гаплотипы черноморских кайнокреадиумов делятся на две группы (Нар 1÷4 и Нар 5÷7), разделённые 42 мутационными событиями; внутри гаплогрупп различия не превышают 5 мутационных шагов (рис. 5). При этом ни гостальной, ни пространственной приуроченности CO1-гаплогрупп не отмечено (рис. 4): в состав каждой из них входят трематоды и от налима, и от глоссы, выловленных в двух черноморских акваториях, которые отстоят друг от друга почти на 200 км вдоль побережья.

Кайнокреадиумы проникли в Чёрное море, очевидно, из Средиземного, освоив при этом совершенно иных, нежели средиземноморские, окончательных и промежуточных хозяев (Корнийчук, 2008). Из предковой формы трематод при этом сформировался новый самостоятельный вид, *C. flesi* (Корнийчук и Гаевская, 2000); очевидно, процессы адаптации к существованию в новых хозяевах продолжаются.

***Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1902.** Мариты черноморских *H. fasciata* (см. рис. 2) по структуре 16S рНК подразделились на три кластера, ни один из которых не отражает узкую специфичность к окончательному хозяину: трематоды от *A. sphyinx* как формируют отдельный кластер, так и присутствуют в составе другого, от рыб-хозяев разных видов.

Отмечено три группы 16S-гаплотипов *H. fasciata*. Нар 4÷7 приурочены только к региону Севастополя; Нар 2 и 3 встречаются лишь на Карадаге; Нар 1 найден у марит от рыб из географически значительно удалённых (более 200 км по прямой между крайними точками) друг от друга акваторий (Севастополь, Батилиман и Карадаг). При этом ни одни из рыб-хозяев не совершают значительных перемещений в пространстве (Световидов, 1964).

Изученный образец марит черноморских *H. fasciata*, паразитирующих в зеленушках-руленах *Symphodus tinca*, по структуре CO1 существенно отличается от хеликометр из остальных обследованных рыб-хозяев, которые группируются на дереве в один общий кластер (рис. 4).

Мы сравнили полученные нами данные о структуре CO1 хеликометр из Чёрного моря с соответствующими данными из GenBank (см. табл. 1) о трематодах *H. fasciata* с побережья Чили. Оказалось, что хеликометры из этой географически удалённой акватории и особи, паразитирующие у черноморских рыб из других семейств, выделяются в самостоятельный кластер.

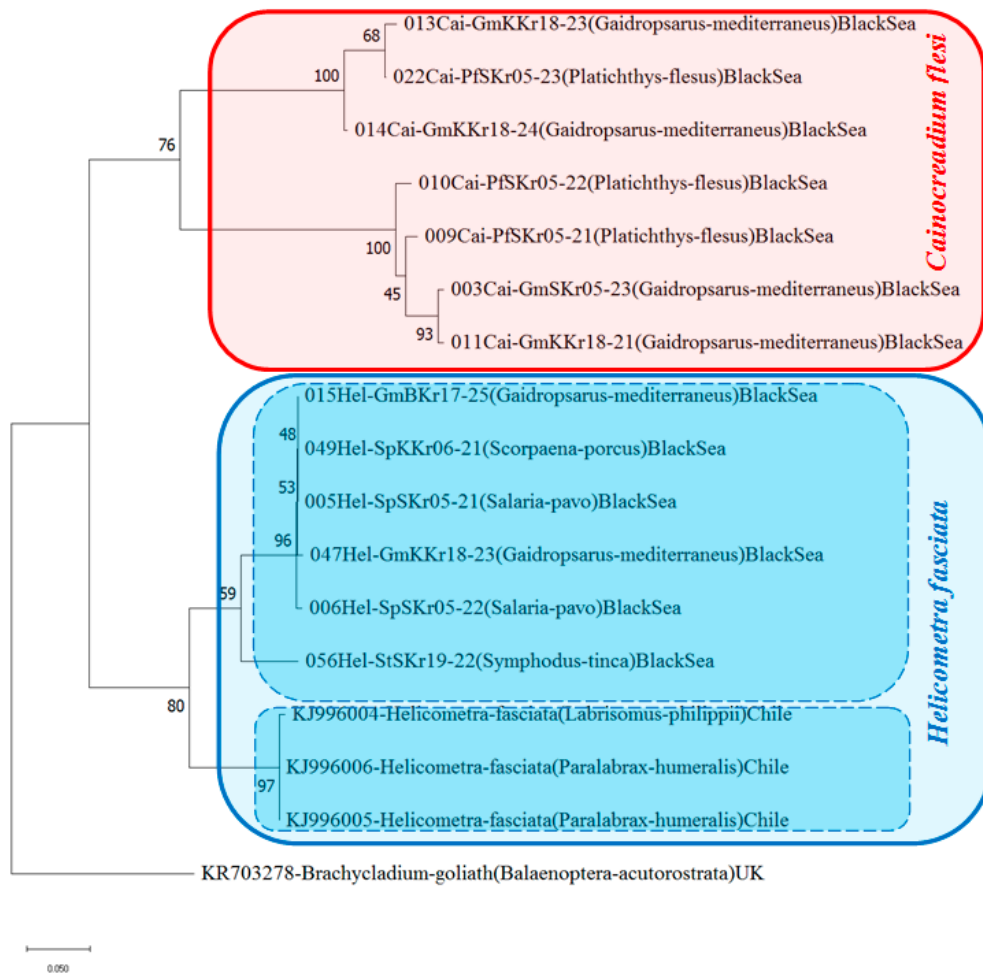


Рис. 4. ML-филограмма по фрагменту митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу цитохром с-оксидазы (CO1) черноморских трематод семейства Opacoelidae

Fig. 4. ML phylogram of Black Sea Opacoelidae trematodes, based on mitochondrial gene fragment, encoding the cytochrome c oxidase subunit I (CO1)

CO1-гаплотипы изученных образцов *H. fasciata* подразделились на три гаплогруппы (рис. 5). Гаплотипы черноморских хеликометр от большинства обследованных черноморских рыб близкородственны (Нар 1÷3, средняя генетическая дистанция — 0,032). От них существенно отличаются хеликометры от зеленушки-рулены *S. tinca* (Нар 4, со средней генетической дистанцией почти в три раза больше вышеописанной внутригрупповой — 0,088).

Наиболее далёкую от остальных гаплогруппу хеликометр (CO1 Нар 5÷6) составляют тихоокеанские представители вида: средняя генетическая дистанция — 0,154 (размах 0,146÷0,158); дистанция от черноморских хеликометр из зеленушки-рулены *S. tinca* — 0,148, от остальных черноморских хеликометр — 0,155.

Значения генетических дистанций между двумя CO1-гаплогруппами хеликометр из Чёрного моря и между каждой из этих групп и тихоокеанскими *H. fasciata* укладываются в установленный рядом исследователей диапазон различий межвидового уровня по CO1 для трематод (León-Règagnon, 2010 ; Pérez-Ponce et al., 2016 ; Rosser et al., 2017 ; Vilas et al., 2005). Эти данные, а также ранее определённое морфологическое своеобразие марит черноморских хеликометр от зеленушек-рулен (Корнийчук, 2000) позволяют предположить, что все три вышеперечисленных CO1-гаплогруппы *H. fasciata* могут оказаться неравнозначными в таксономическом отношении. Проверка гипотезы требует проведения комплексного исследования предполагаемого

видового комплекса *Helicometra* — получения более полных сведений о CO1-гаплотипическом составе гостальных группировок мариит, изучения морфологических особенностей хеликометр, принадлежащих к разным CO1-гаплогруппам, и оценки наличия переходных морфотипов.

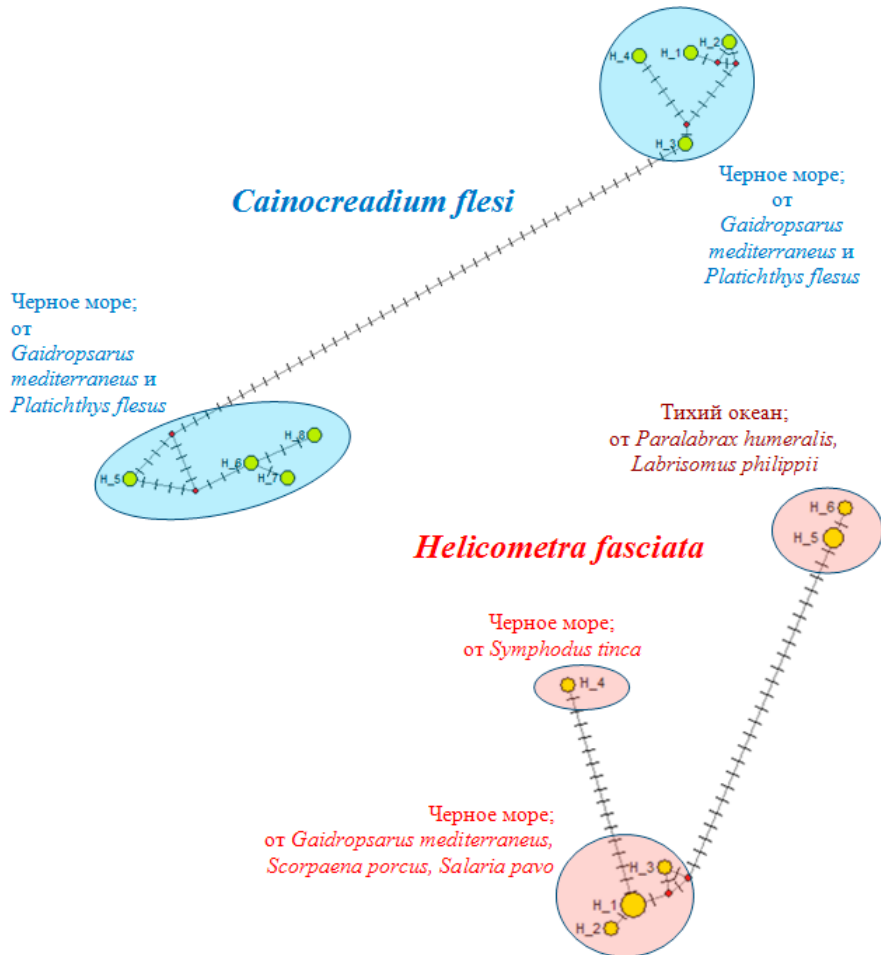


Рис. 5. Сети CO1-гаплотипов черноморских трематод
Fig. 5. Haplotype networks of CO1 of Black Sea trematodes

***Gaevskajatrema perezii* (Mathias, 1926) Gibson & Bray, 1982.** Трематоде *G. perezii* специфичны исключительно к рыбам из семейства Губановых (Labridae) и в Чёрном море обычны у этих хозяев (Корнийчук, 2001). Обследованные нами марииты данного вида из черноморских зеленушек двух видов оказались однородными по структуре фрагмента 16S (рис. 2). Этот вывод интересно будет проверить с использованием других маркеров.

В целом применение двух митохондриальных маркеров для решения вопроса о статусе видов опецелидных трематод показало свою перспективность. Очевидно, что вовлечение в анализ новых образцов из различных хозяев и акваторий предоставит много уникальных данных о видовом разнообразии и внутривидовой генетической структуре этих трематод.

Полученные сведения о структуре фрагментов митохондриального гена, кодирующего рибосомную РНК 16S, и митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу цитохром с-оксидазы (CO1), обследованных черноморских трематод депонированы в GenBank (см. табл. 1) и интегрированы на сайт подколлекции паразитических организмов коллекции гидробионтов Мирового океана ФИЦ ИнБЮМ (<http://marineparasites.org/taxa/?dna-sequences>).

Выводы:

1. Для амплификации фрагмента гена CO1 трематод родов *Cainocreadium* и *Helicometra* впервые разработаны праймеры PlagiHepC1F и OreCo1uniR2.
2. Впервые определены нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриальных генов черноморских трематод: гена 16S видов *Cainocreadium flesi* Korniychuk & Gaevskaya, 2000, *Gaevskajatrema perezi* (Mathias, 1926) Gibson & Bray, 1982 и *Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1902 и гена CO1 видов *C. flesi* и *H. fasciata* — от разных видов дефинитивных хозяев — рыб.
3. У трематод *C. flesi* не выявлено гостально специфичных группировок по структуре фрагментов митохондриальных генов 16S и CO1, однако отмечено высокое CO1-нуклеотидное разнообразие.
4. У марит черноморских *H. fasciata* от зеленушки-рулены *Symphodus tinca* выявлен CO1-гаплогрупп, существенно дистанцирующийся от CO1-гаплогруппы *H. fasciata* из прочих изученных рыб-хозяев; таксономический статус хеликометр от *S. tinca* требует уточнения. При анализе последовательностей фрагмента митохондриального гена 16S рРНК хеликометр гостальных генетических линий выделить не удалось.
5. CO1-гаплогруппа тихоокеанских представителей *H. fasciata* существенно удалена от гаплогрупп черноморских представителей, что требует уточнения таксономического статуса также и тихоокеанских *H. fasciata*.
6. Различия в структуре изученного фрагмента гена 16S у черноморских трематод *G. perezi* из окончательных хозяев разных видов не обнаружены.

Исследования выполнены по гранту РФФИ № 18-44-920027 p_a и частично в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (№ гос. регистрации АААА-А18-118020890074-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гаевская А. В., Корнийчук Ю. М. Паразитические организмы как составляющая экосистем черноморского побережья Крыма // *Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (черноморский сектор)* / под ред. В. Н. Еремеева, А. В. Гаевской; НАН Украины, Институт биологии южных морей. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. С. 425–490. [Gaevskaya A. V., Korniychuk Yu. M. Paraziticheskie organizmy kak sostavlyayushchaya ekosistem chernomorskogo poberezh'ya Kryma. In: *Sovremennoe sostoyanie bioraznoobraziya pribrezhnykh vod Kryma* / V. N. Eremeev, A. V. Gaevskaya (Eds); NAN Ukrainy, Institut biologii yuzhnykh morei. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2003, pp. 425–490. (in Russ.)].
2. Гаевская А. В., Солонченко А. И. Новые данные о трематодах черноморских рыб // *Биологические науки: научные доклады высшей школы*. 1989. № 5. С. 43–47. [Gaevskaya A. V., Solonchenko A. I. Novye dannye o trematodakh chernomorskikh ryb. *Biologicheskie nauki: nauchnye doklady vysshei shkoly*, 1989, no. 5, pp. 43–47. (in Russ.)]
3. Дмитриева Е. В., Полякова Т. А., Корнийчук Ю. М., Пронькина Н. В., Плаксина М. П., Юрахно В. М., Лебедовская М. В., Лозовский В. Л., Белоусова Ю. В. Паразиты морских гидробионтов // *Биология Чёрного моря у берегов Юго-Восточного Крыма* / под ред. Н. С. Костенко. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. Гл. 3.1.4. С. 96–130. [Dmitrieva E. V., Polyakova T. A., Korniychuk Yu. M., Pron'kina N. V., Plaksina M. P., Yurakhno V. M., Lebedovskaya M. V., Lozovskii V. L., Belousova Yu. V. Parazity morskikh gidrobiontov. In: *The Biology of the Black Sea Offshore Area at the South-Eastern Crimea* / N. S. Kostenko (Ed.). Simferopol: PP "Ariall", 2018, chap. 3.1.4, pp. 96–130. (in Russ.)]

4. Катохин А. В., Корнийчук Ю. М. Первые данные генотипирования черноморских трематод родов *Cainocreadium* и *Helicometra* (Trematoda: Opencelidae) // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3, № 4. С. 36–42. [Katokhin A. V., Korniyuchuk Yu. M. First data of ITS1-genotyping of the Black Sea trematodes *Cainocreadium* and *Helicometra* (Trematoda: Opencelidae). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 36–42. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.04>
5. Корнийчук Ю. М. О морфологической изменчивости черноморских представителей рода *Helicometra* (Trematoda: Opencelidae) // *Экология моря*. 2000. Вып. 51. С. 40–44. [Korniyuchuk J. M. Morphological variability of genus *Helicometra* (Trematoda: Opencelidae) maritae from the Black Sea. *Ekologiya morya*, 2000, iss. 51, pp. 40–44. (in Russ.)]
6. Корнийчук Ю. М. О структуре трематодофауны черноморских губановых рыб (Pisces: Labridae) // *Экология моря*. 2001. Вып. 58. С. 32–36. [Korniyuchuk J. M. Structure of the trematode fauna of the Black Sea labrid fishes (Pisces: Labridae). *Ekologiya morya*, 2001, iss. 58, pp. 32–36. (in Russ.)]
7. Корнийчук Ю. М. Трематоды рода *Cainocreadium* (Opencelidae) в Чёрном и Средиземном морях // *Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения* : материалы IV Всерос. съезда Паразитологического общества при Российской академии наук. Санкт-Петербург, 2008. Т. 2. С. 77–80. [Korniyuchuk Yu. M. Trematody roda *Cainocreadium* (Opencelidae) v Chernom i Sredizemnom moryakh. In: *Parazitologiya v XXI veke – problemy, metody, resheniya* : materialy IV Vseros. s'ezda Parazitologicheskogo obshchestva pri Rossiiskoi akademii nauk. Saint Petersburg, 2008, vol. 2, pp. 77–80. (in Russ.)]
8. Корнийчук Ю. М. Дополненное описание гермафродитного поколения трематоды черноморских рыб *Helicometra fasciata* (Trematoda, Opencelidae) // *Вестник зоологии*. 2009. Отд. вып. № 23. С. 63–68. [Korniyuchuk Yu. M. Additional description of hermaphroditic generation of trematodes Black Sea fishes, *Helicometra fasciata* (Trematoda, Opencelidae). *Vestnik zoologii*, 2009, spec. iss. 23, pp. 63–68. (in Russ.)]
9. Корнийчук Ю. М., Гаевская А. В. *Cainocreadium flesi* sp. n. (Trematoda, Opencelidae) – новый вид трематод черноморских рыб // *Вестник зоологии*. 2000. Т. 34, № 6. С. 89–91. [Korniyuchuk Yu. M., Gaevskaya A. V. *Cainocreadium flesi* sp. n. (Trematoda, Opencelidae) – A new trematode from the Black Sea fishes. *Vestnik zoologii*, 2000, vol. 34, no. 6, pp. 89–91. (in Russ.)]
10. *Определитель паразитов позвоночных Чёрного и Азовского морей* : Паразитические беспозвоночные рыб, рыбоядных птиц и морских млекопитающих / [сост. А. В. Гаевская, А. В. Гусев, С. Л. Делямуре и др.] ; АН УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. Киев : Наукова думка, 1975. 551 с. [*Opredelitel' parazitov pozvonochnykh Chernogo i Azovskogo morei* : Paraziticheskie bespozvonochnye ryb, ryboyadnykh ptits i mlekopitayushchikh / [A. V. Gaevskaya, A. V. Gusev, S. L. Delyamure, etc. (Eds)] ; AN USSR, In-t biologii yuzh. morei im. A. O. Kovalevskogo. Kiev : Naukova dumka, 1975, 551 p. (in Russ.)]
11. Световидов А. Н. *Рыбы Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : Наука, 1964. 551 с. [Svetovidov A. N. *Ryby Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad : Nauka, 1964, 551 p. (in Russ.)]
12. Andres M. J., Ray C. L., Pulis E. E., Curran S. S., Overstreet R. M. Molecular characterization of two opencelid trematodes from fishes in the Gulf of Mexico, with a description of a new species of *Helicometra*. *Acta Parasitologica*, 2014, vol. 59, iss. 3, pp. 405–412. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0258-7>
13. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, vol. 16, iss. 1, pp. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
14. Blasco-Costa I., Cutmore S. C., Miller T. L., Nolan M. J. Molecular approaches to trematode systematics: 'Best practice' and implications for future study. *Systematic Parasitology*, 2016, vol. 93, iss. 3, pp. 295–306. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9631-2>
15. Born-Torrijos A., Kostadinova A., Raga J. A., Holzer A. S. Molecular and morphological identification of larval opencelids (Digenea: Opencelidae) parasitising prosobranch snails in a Western Mediterranean lagoon. *Parasitology*

- International*, 2012, vol. 61, iss. 3, pp. 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.03.002>
16. Bray R. A., Cribb T. H., Littlewood D. T., Waeschenbach A. The molecular phylogeny of the digenean family Opcoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily. *Folia Parasitologica*, 2016, vol. 63, art. no. 013 (11 p.). <https://doi.org/10.14411/fp.2016.013>
 17. Briscoe A. G., Bray R. A., Brabec J., Littlewood D. T. The mitochondrial genome and ribosomal operon of *Brachycladium goliath* (Digenea: Brachycladiidae) recovered from a stranded minke whale. *Parasitology International*, 2016, vol. 65, iss. 3, pp. 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.02.004>
 18. Donald K. M., Kennedy M., Poulin R., Spencer H. G. Host specificity and molecular phylogeny of larval Digenea isolated from New Zealand and Australian topshells (Gastropoda: Trochidae). *International Journal for Parasitology*, 2004, vol. 34, iss. 5, pp. 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.027>
 19. Donald K. M., Spencer H. G. Host and ecology both play a role in shaping distribution of digenean parasites of New Zealand whelks (Gastropoda: Buccinidae: *Cominella*). *Parasitology*, 2016, vol. 143, iss. 9, pp. 1143–1156. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000494>
 20. González M. T., Henriquez V., Lopes Z. Variations in the fecundity and body size of digenean (Opcoelidae) species parasitizing fishes from Northern Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 2013, vol. 48, no. 3, pp. 421–429. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000300002>
 21. Heneberg P., Sitko J., Bizos J. Integrative taxonomy of central European parasitic flatworms of the family Prosthogonimidae Lühe, 1909 (Trematoda: Plagiorchiida). *Parasitology International*, 2015, vol. 64, iss. 5, pp. 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.02.003>
 22. Jousson O., Bartoli P. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opcoelidae) parasitic in marine fishes. *International Journal for Parasitology*, 2001, vol. 31, iss. 7, pp. 706–714. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00180-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00180-1)
 23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 24. Lagrue C., Joannes A., Poulin R., Blasco-Costa I. Genetic structure and host-parasite co-divergence: Evidence for trait-specific local adaptation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2016, vol. 118, iss. 2, pp. 344–358. <https://doi.org/10.1111/bij.12722>
 25. León-Règagnon V. Evidence of new species of *Haematoloechus* (Platyhelminthes: Digenea) using partial *cox1* sequences, mitochondrial DNA. *The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2010, vol. 21, iss. s1., pp. 12–17. <https://doi.org/10.3109/19401736.2010.523700>
 26. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, iss. 11, pp. 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
 27. López Z., Cárdenas L., Runil F., González M. T. Contrasting definitive hosts as determinants of the genetic structure in a parasite with complex life cycle along the south-eastern Pacific. *Molecular Ecology*, 2015, vol. 24, iss. 5, pp. 1060–1073. <https://doi.org/10.1111/mec.13080>
 28. Martin S. B., Huston D. C., Cutmore S. C., Cribb T. H. A new classification for deep-sea opcoelid trematodes based on the phylogenetic position of some unusual taxa from shallow-water, herbivorous fishes off south-west Australia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2019, vol. 186, iss. 2, pp. 385–413. <https://doi.org/10.1093/zoolinlean/zly081>
 29. Pérez-Ponce D. E., León G., García-Varela M., Pinacho-Pinacho C. D., Sereno-Uribe A. L., Poulin R. Species delimitation in trematodes using DNA sequences: Middle-American *Clinostomum* as a case study. *Parasitology*, 2016, vol. 143, iss. 13, pp. 1773–1789. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001517>
 30. Rosser T. G., Alberson N. R., Woodyard E. T., Cunningham F. L., Pote L. M., Griffin M. J. *Clinostomum album* n. sp. and *Clinostomum marginatum* (Rudolphi, 1819), parasites of the great egret *Ardea alba* L. from Mississippi, USA. *Systematic Parasitology*, 2017, vol. 94, iss. 1, pp. 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9686-0>

31. Shekhovtsov S. V., Katokhin A. V., Kolchanov N. A., Mordvinov V. A. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitology International*, 2010, vol. 59, iss. 1, pp. 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.012>
32. Vilas R., Criscione C. D., Blouin M. S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology*, 2005, vol. 131, iss. 6, pp. 839–846. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008437>
33. Wilke T., Davis G. M., Qiu D. C., Spear R. C. Extreme mitochondrial sequence diversity in the intermediate schistosomiasis host *Oncomelania huipensis robertsoni*: Another case of ancestral polymorphism? *Malacologia*, 2006, vol. 48, no. 1, pp. 43–157.
34. Yano A., Urabe M. Larval stages of *Neoplaxiopus elongatus* (Goto and Ozaki, 1930) (Opcoelidae: Plaxioporinae), with notes on potential second intermediate hosts. *Parasitology International*, 2017, vol. 66, iss. 2, pp. 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.012>

GENOTYPING OF BLACK SEA TREMATODES OF THE FAMILY OPECOELIDAE BY MITOCHONDRIAL MARKERS

A. V. Katokhin¹ and Yu. M. Kornychuk²

¹Institute of Cytology and Genetics of SB of RAS, Novosibirsk, Russian Federation

²A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: katokhin@bionet.nsc.ru

Opcoelidae Ozaki, 1925 (Trematoda: Opcoeloidea) is the biggest trematode family in the Black Sea in terms of species and genera number. Maritae of the most common Black Sea Opcoelidae trematodes are well described morphologically; nevertheless, information on their genomes structure is sketchy, and data on mitochondrial genomes are absent. The aim was to study the structure of mitochondrial genome fragments of Black Sea trematode species: *Cainocreadium flesi* Kornychuk & Gaevskaya, 2000, *Gaevskajatrema perezi* (Mathias, 1926) Gibson & Bray, 1982, and *Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1902. Sequences were made for CO1 (the cytochrome c oxidase subunit I) and 16S mitochondrial genes. To amplify CO1 gene fragment of *Cainocreadium* and *Helicometra* trematodes, primers were developed. Phylogenetic relationships within the analyzed part of the Opcoelidae family were reconstructed on the basis of our data and the corresponding GenBank data by the Maximum Likelihood algorithm, implemented in MEGA X program. To root the phylogenetic trees, the corresponding sequences of the closely related trematode *Brachycladium goliath* (Brachycladioidea: Brachycladiidae) were used. For the first time, nucleotide sequences of CO1 and 16S mitochondrial genes fragments of Black Sea trematodes *C. flesi*, *G. perezi*, and *H. fasciata* from different definitive fish hosts were identified and deposited in GenBank. In case of *C. flesi*, no host-specific lines were found in the structure of CO1 mitochondrial gene fragment, but high CO1 nucleotide diversity was noted. Black Sea *H. fasciata*, parasitizing peacock wrasse, *Symphodus tinca*, were revealed to be a host-specific CO1 haplogroup; its taxonomic status requires further clarification, and ecological and genetic studies of the putative *H. fasciata* species complex from different water areas are needed. No host-specific genetic lines were found when analyzing the sequences of *H. fasciata* 16S rRNA mitochondrial gene fragment. No significant differences in 16S fragment were registered between *G. perezi* trematodes from different Black Sea definitive hosts; however, the intraspecific 16S nucleotide diversity was rather high.

Keywords: Black Sea, Trematoda, Opcoelidae, *Cainocreadium*, *Gaevskajatrema*, *Helicometra*, mitochondrial genes, CO1, 16S rRNA