

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

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

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

*e-mail: shedko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

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

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, систематика, молекулярные часы.

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

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

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

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

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

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

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

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

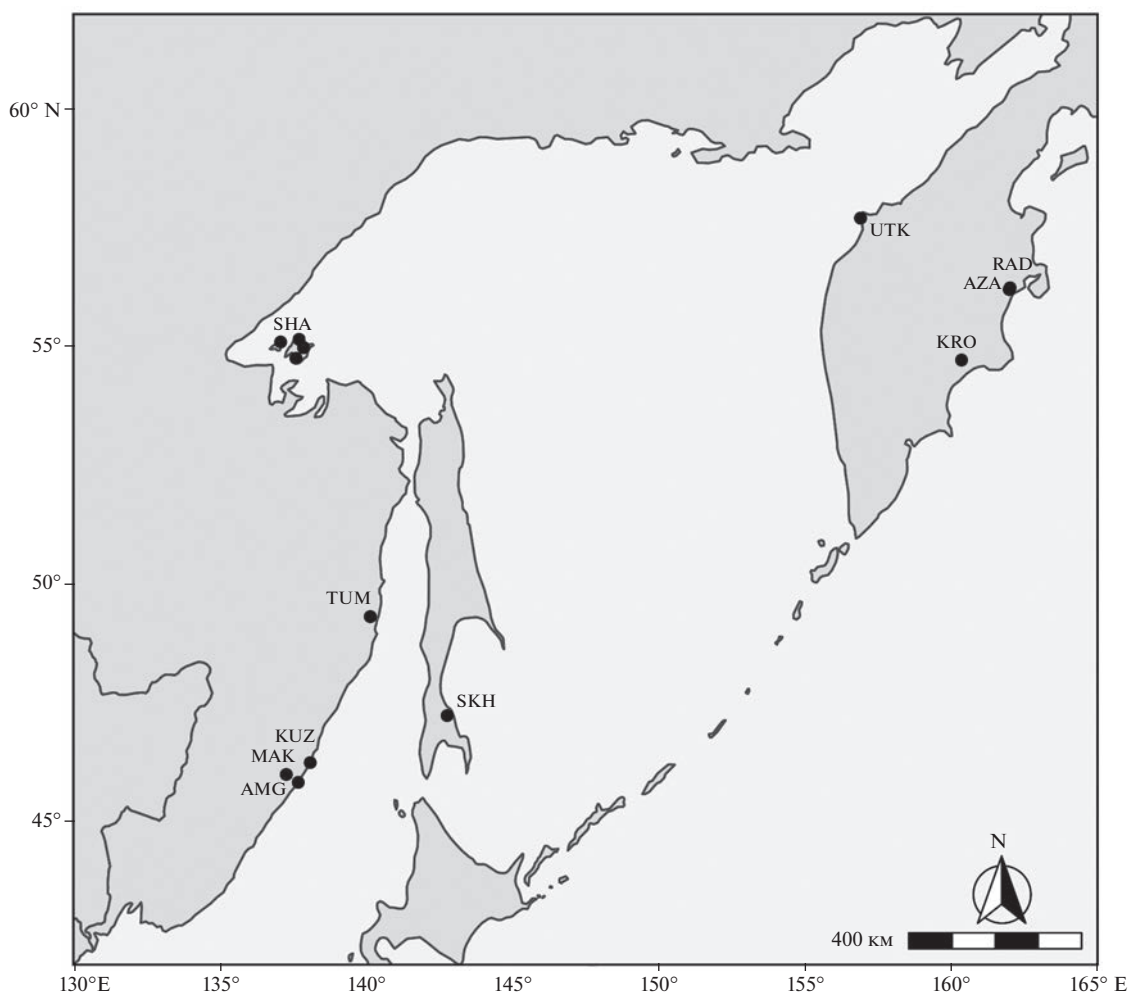


Рис. 1. Географическое расположение выборок копепод *Salmincola* с Дальнего Востока России. Код выборки см. табл. 1.

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

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

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

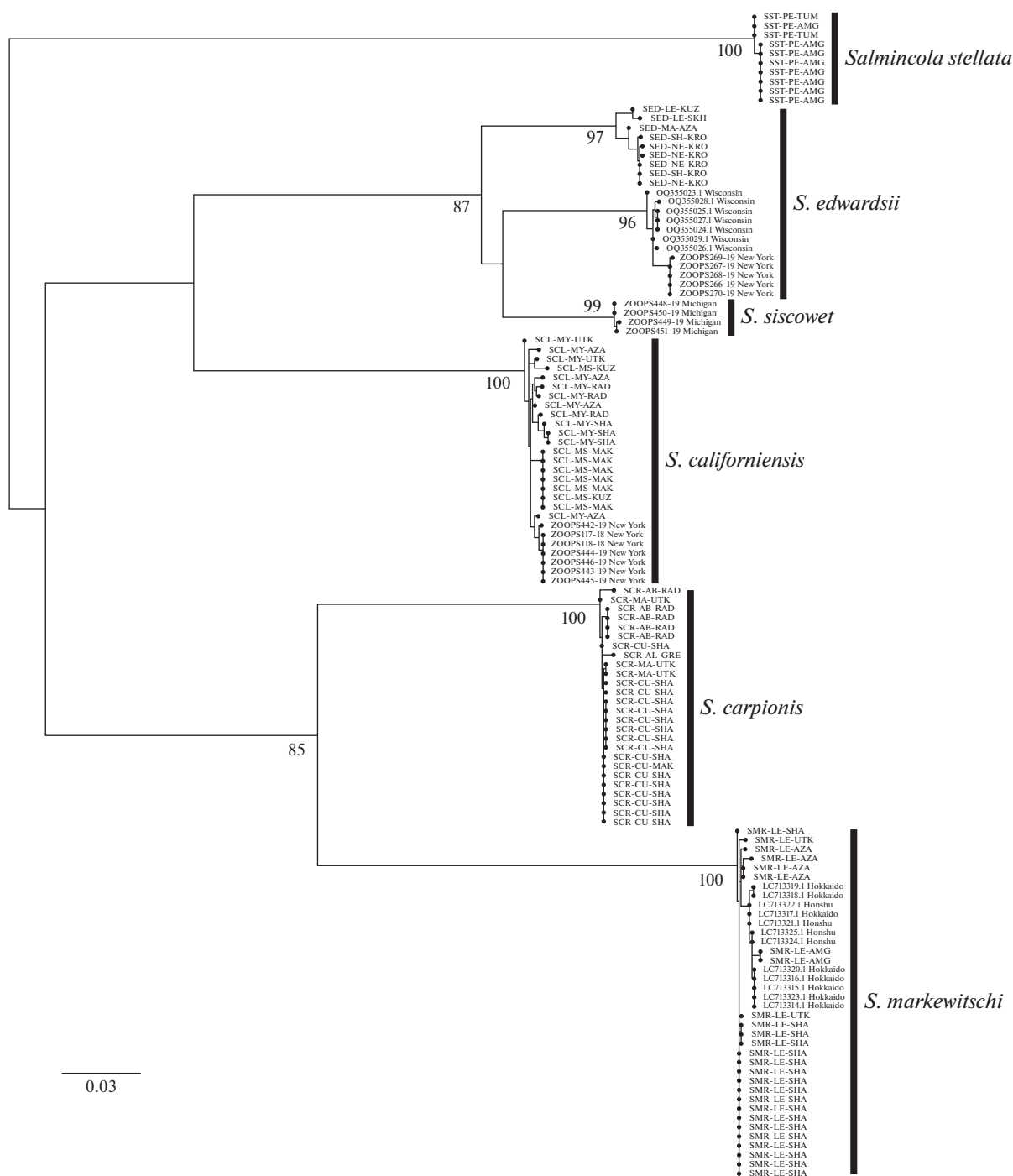


Рис. 2. Оптимальное ML-дерево ($\ln L = -2971.66$), построенное для фрагмента гена *COI* копепод *Salmincola*, укорененное по срединной точке. Цифры у основания клад – оценки бутстреп-поддержки (в % от 2000 циклов, показаны только для основных клад и только превышающие уровень 70%); название последовательностей,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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

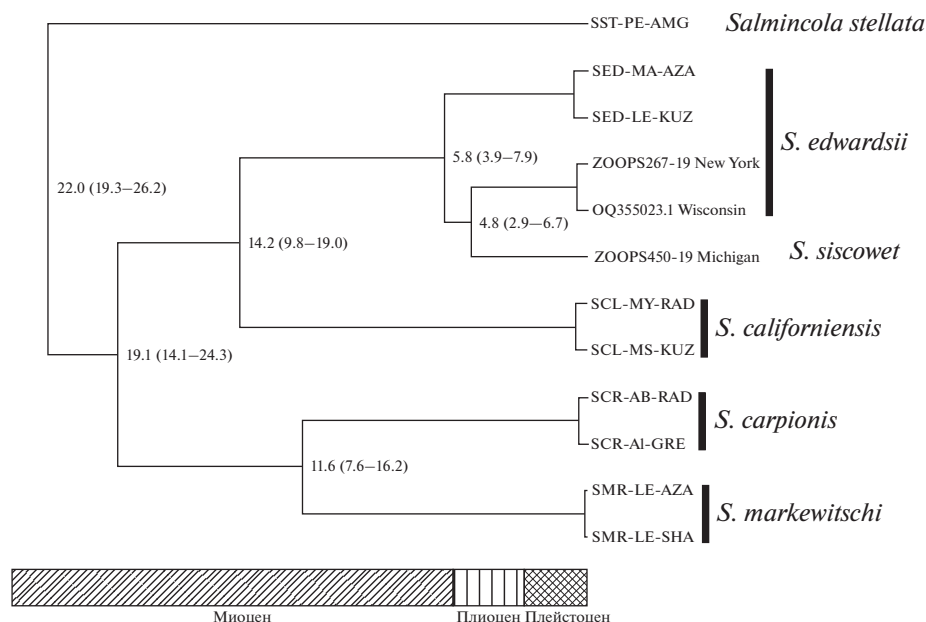


Рис. 3. Байесовская хронограмма филогении копепод *Salmincola*, построенная на основе анализа фрагмента гена *COI*. Цифры — эволюционный возраст в млн лет (в скобках — 95%-ные интервалы наивысшей апостериорной плотности).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

Keywords: mitochondrial DNA, molecular systematics, molecular clock.