ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Болбат Александр Васильевич

СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА РЕЛИКТОВЫХ ПИЯВОК

1.5.7. – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: кандидат биологических наук Кайгородова Ирина Александровна

Иркутск – 2022

Оглавление

Спис	ок сокращений 4				
Введе	ение 5				
Глав	а 1. Обзор литературы 15				
1.1.	Современное состояние знаний о реликтовых пиявкоподобных паразитах				
1.1.1.	Общая характеристика и морфологические особенности акантобделлид 15				
1.1.2.	Ареал обитания и хозяева				
1.1.3.	История изучения эволюции акантобделлид 23				
1.2.	Митохондриальный геном животных 30				
1.2.1.	Структура митохондриального генома животных				
1.2.2	Проблема аннотации митохондриальных геномов и теория тРНК-пунктуации 35				
1.2.3.	. Использование митохондриальных геномов в эволюционной биологии				
1.3	Современные методы эволюционных исследований 42				
1.3.1.	. Особенности секвенирования нового поколения				
1.3.2.	. Обзор методов молекулярной эволюции и филогении 46				
1.3.3.	Сегментация данных				
1.3.4.	Методы молекулярной делимитации таксонов				
Глав	а 2. Материалы и методы 59				
2.1.	Сбор, идентификация и фиксация образцов				
2.2.	Выделение и секвенирование ДНК				
2.3.	Сборка митохондриальных геномов				
2.4.	Аннотация митохондриальных геномов				
2.5.	Филогенетический анализ и молекулярная делимитация таксонов				
Глав	а 3. Структура митохондриального генома аннелид 66				
3.1.	Характеристика данных секвенирования нового поколения				
3.2.	Характеристика результатов геномной сборки				
3.3.	Структура и порядок генов митохондриального генома аннелид 70				
3.3.1.	Общая характеристика аннотированных митохондриальных геномов 70				
3.3.2.	Аннотация митогенома Acanthobdella peledina 7				
3.3.3.	Аннотация митогенома Paracanthobdella livanowi 78				
Глав	а 4. Эволюция митохондриального генома акантобделлид 81				
4.1.	Филогения на основе маркерных фаргментов				
4.1.2.	Филогения на основе маркерного участка гена <i>cox1</i>				
4.1.3.	Филогения на основе маркерного участка гена <i>12S</i>				
4.2.	Филогения митохондриальных геномов				

4.3. Сравнение результатов филогенетической реконструкции	90	
Заключение		
Выводы		
Список литературы		
Список иллюстративного материала		
ПРИЛОЖЕНИЯ		
Список видов группы сравнения с краткой характеристикой их митогеномов.		

- 3 Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного фрагмента *cox1*.
- 4 Максимально правдоподобное древо на основе сегментированного фрагмента *cox1*.
- 5 Байесовское древо на основе несегментированного фрагмента *cox1*.
- 6 Байесовское древо на основе сегментированного фрагмента *cox1*.
- 7 Байесовское древо на основе несегментированного фрагмента *12S*.
- 8 Байесовское древо на основе сегментированного фрагмента *12S*.
- 9 Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного фрагмента 12S.
- 10 Максимально правдоподобное древо на основе сегментированного фрагмента 12S.
- 11 Байесовское древо на основе несегментированного набора последовательностей полных митогеномов.
- 12 Байесовское древо на основе сегментированного набора последовательностей полных митогеномов.
- 13 Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного набора последовательностей полных митогеномов.
- 14 Максимально правдоподобное древо на основе сегментированного набора последовательностей полных митогеномов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ аденозиндифосфат
- АТФ аденозинтрифосфат
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- кб. килобаза (= 1000 нуклеотидных оснований)
- мин. минута
- мкл микролитр
- мм миллиметр
- об./мин. обороты в минуту
- ОТЕ оперативные таксономические единицы
- п.н. пары нуклеотидных оснований
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- РНК рибонуклеиновая кислота
- сек. секунда
- BI байесовский метод (Bayesian Inference)
- СТАВ цетилтриметиламмоний бромид (Cetriltrimethylammonium Bromide)
- EDTA этилендиаминтетрауксусная кислота (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
- ESS эффективный размер выборки (Effective Sample Size)
- GMYC метод обобщённой смешанной коалесценции Юла (Generalized Mixed Yule Coalescent)
- MCMC цепи Маркова-Монте-Карло (Markov Chain Monte-Carlo)
- ML метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood)
- NUMTs ядерные копии митохондриального генома (Nuclear Mitochondrial DNA)
- PE парноконцевые прочтения (Paired End)
- RBS сайт связывания рибосом (Ribosome Binding Site)
- RCF относительное центробежное ускорение (Relative Centrifugal Force)
- SE одноконцевые прочтения (Single End)
- SRA международная база коротких прочтений (Sequence Read Archive)

введение

Актуальность исследования

Митохондриальный геном животных содержит информацию о структуре ключевых белковых компонентов дыхательной цепи, а также рибосомальных и транспортных РНК, необходимых для реализации этой информации. Несмотря на способность митохондрий импортировать отдельные белки, синтезируемые в цитоплазме, выраженная гидрофобность некоторых компонентов электронтранспортной цепи затрудняет их перенос на внутреннюю мембрану митохондрий [64]. Это привело к сохранению у митохондрий части генома альфагенов [126]. В протеобактерий С консервативным набором связи С консервативностью, гаплоидным характером наследования и ограниченной рекомбинацией [158], митохондриальный геном животных является важным объектом для изучения, поскольку реконструкция его эволюции может быть с высокой уверенностью интерпретирована как реальная эволюционная история организма. По сравнению с ядерным митохондриальный геном требует вчетверо меньшего эффективного размера популяции для сортировки линий ("lineage sorting") [135].

На сегодняшний день уровень развития молекулярно-генетических методов исследования и биоинформационного анализа предлагает относительно дешёвые и усовершенствованные технологии ДНК-секвенирования, позволяющие рутинно проводить полногеномноые исследования, которые ранее требовали больших экономических затрат. Реконструкция геномов организмов, временных И исследование экспрессии их генов, получение сотен генных локусов ДЛЯ эволюционных исследований, изучение некультивируемых организмов в составе сообществ и даже обнаружение эпигенетических сигналов теперь ограничиваются лишь методиками обработки, а не получения данных [129, 139, 142, 150, 170]. Гораздо больше, чем ранее, стало известно о структуре наследственного материала, принципах его действия и передачи последующим поколениям. В связи с этим наиболее остро встаёт вопрос изучения генетической структуры таких

ключевых групп организмов, как реликтовые пиявкоподобные паразиты отряда Acanthobdellida, являющихся одной из малоизученных фаунистических групп, испытывающих на себе сильное антропогенное влияние и сокращающих свой ареал в Европе [41, 93].

Реликтовые пиявки вызывают научный интерес на протяжении столетия ввиду их предполагаемого промежуточного эволюционного положения между малощетинковыми червями (Oligochaeta) и пиявками (Hirudinea), что само по себе делает актуальным настоящее исследование. Вопрос точного эволюционного положения и классификации организмов данной группы невозможно разрешить с морфологических признаков, использованием одних В TOM числе из-за [31,153]. неоднозначности ИХ интерпретации Сложности получения биологического материала ввиду труднодоступности мест обитания акантобделл, биологического цикла и экологических особенностей на специфики ИХ сегодняшний день позволили получить лишь единичные сведения о первичной фрагментов их генома, на основе которых оценка структуре отдельных филогенетического положения акантобделлид оказалась неоднозначной [17, 52, 93, 127, 128, 150, 161, 171, 184, 185]. Однако, изучение древних, исчезающих организмов, позволяет пролить свет на заключённую в них генетическую летопись, что приближает нас к пониманию молекулярных механизмов в основе адаптации видов к их экологической нише. Использование современных методов полногеномного секвенирования (NGS) даёт возможность в параллельном режиме расшифровать значительную долю всего генетического материала организма при отсутствии референсных данных о его структуре, что позволяет получить недостижимый ранее объём данных и значительно повысить достоверность эволюционных исследований. Эти условия идеально подходят для изучения реликтовых пиявок.

Степень разработанности темы исследования

Изучение генетической структуры И основанной на ЭТИХ данных эволюционной истории кольчатых червей В общем И представителей Acanthobdellida в частности были начаты в конце XX века [171]. Однако ранние

работы по молекулярной эволюции кольчецов имеют ряд изъянов, связанных с длиной, качеством и применимостью отдельных генетических маркеров для исследования филогении на разных таксономических уровнях [17, 171, 172]. На сегодняшний день полногеномных исследований акантобделлид не проводилось. Литературные сведения о филогении и молекулярной систематике кольчатых червей противоречивы, не согласуются выводы даже одних и тех же авторских коллективов, опубликованные в разные годы [17, 31, 52, 93, 127, 128, 161, 171, 172, 184, 185]. Единственная работа, посвящённая изучению эволюционной истории акантобделлид с применением технологий секвенирования нового поколения, оперирует множеством нестандартизированных гомологичных локусов, В основном из ядерного генома [150], что затрудняет использование этих данных в последующих исследованиях. В настоящее время остро ощущается недостаток информации о структуре генома Acanthobdella peledina, и полностью отсутствуют какие-либо генетические данные по виду *Paracanthobdella livanowi*, считающихся «живыми реликтами» и являющихся важными звеньями для понимания эволюции мировой фауны кольчецов.

Цели и задачи

Целью данной работы является получение сведений о структуре полного митохондриального генома, степени генетической и таксономической дивергенции и эволюционной истории представителей отряда Acanthobdellida.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести полногеномное секвенирование образцов реликтовых пиявок из различных, географически разобщённых мест обитания и реконструировать первичную структуру их митохондриальных геномов.

2. Аннотировать полученные нуклеотидные последовательности.

3. Реконструировать эволюционную историю митохондриальных геномов реликтовых пиявок, оценить степень их генетической дивергенции и применимость полных митохондриальных геномов и их фрагментов для интерпретации филогении и молекулярной делимитации таксонов исследуемой группы.

Научная новизна

Впервые методом секвенирования нового поколения получены полногеномные данные для восьми образцов акантобделлид из географически разрозненных водных бассейнов Евразии от Швеции до Камчатки (Acanthobdella peledina и Paracanthobdella livanowi), а также четырех образцов эндемичных гирудинид оз. Байкал (Baicaloclepsis echinulata, Baicaloclepsis grubei и два образца Codonobdella sp.). Кроме того, были собраны и аннотированы митохондриальные геномы восьми образцов из 7 видов аннелид (Lumbriculus variegatus, Glossiphonia complanata, Glossiphonia concolor, Theromyzon tessulatum, Piscicola geometra, Erpobdella octoculata и два образца Haemopis sanguisuga), необработанные прочтения которых доступны в международной базе коротких прочтений SRA. Впервые полные митохондриальные геномы акантобделлид были использованы для реконструкции филогенетической истории кольчатых червей. Получены первые сведения о генетических дистанциях между представителями вида A. peledina из разных мест обитания, а также их дистанций до представителей вида *P. livanowi*. Результаты данной работы позволили разрешить спорные вопросы систематики кольчатых червей: уточнить положение акантобделлид в системе Clitellata и таксономический статус A. peledina и P. livanowi.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Результаты данной работы дают первое представление о структуре митохондриального генома реликтовых пиявок, что позволило разрешить фундаментальные научные проблемы систематики и эволюции кольчатых червей.

Результаты секвенирования и сборки генетических последовательностей акантобделлид и других кольчатых червей внесли существенный вклад в международные базы генетических данных, пополнив достоверной ИХ информацией. что создаёт предпосылки для конструирования научно обоснованных филогений и систем молекулярной идентификации биологических образцов, в том числе и частично сохранных. Данные о внутри- и межвидовой генетической вариабельности, полученные в данной работе, могут быть

использованы в дальнейших исследованиях таксономического и филогенетического разнообразия кольчатых червей.

Общий объём данных, полученных в ходе полногеномного секвенирования, значительно превышает объём данных, необходимых для реконструкции митохондриального генома, что позволяет использовать их в дальнейших исследованиях.

Материалы диссертации могут служить основой при подготовке лекционных курсов и учебных пособий для учащихся ВУЗов и подготовки научных кадров высшей квалификации.

Методология и методы диссертационного исследования

В данной работе была использована технология высокопроизводительного Illumina. необработанных секвенирования Контроль качества данных секвенирования И сборка митохондриальных проводились геномов С использованием компьютерных программ: FastQC [16], Trimmomatic v. 0.40 [23], Mira v. 5 [38], Tablet [132]. Для разрешения сложных и повторяющихся участков был разработан собственный скрипт «fastq grep» на языке Python 3, позволяющий извлекать ИЗ сырых данных секвенирования отдельные прочтения И конвертировать их в формат Fasta. Полученные прочтения выравнивались относительно друг друга с использованием программы Clustal Omega v. 1.2.4 [173]. Для оценки правильности сборки повторяющихся участков проводилось рекурсивное картирование прочтений на собранный митохондриальный геном с использованием программы Bowtie2 v. 2.3.5.1 [108]. Геном считался собранным правильно при достижении равномерного покрытия по всей длине.

Процесс *de novo* аннотации митохондриального генома был разделён на несколько этапов. Первый этап – аннотация транспортных РНК при помощи программы Aragorn v 1.2.40 [110]. Второй этап – аннотация белок-кодирующих последовательностей с использованием веб-интерфейса программы Expasy Translate [53]. Последним этапом была проведена аннотация генов рибосомальной РНК с использованием программы barrnap [169].

Программа Mafft v7.453 [92] была использована для выравнивания полученного набора данных. Для реконструкции эволюционной истории применялся комплекс филогенетических программ - IQ-TREE v. 2.1.3 [134], BEAST v. 2.6.4 [25], PartitionFinder2 [107], jModelTest 2 [42], Tracer v. 1.7.1 [155]. Графическое оформление древа проводили в FigTree [58] и Inkscape [86]. Сходство топологий полученных деревьев оценивали узловым («nodal») алгоритмом в TOPD/FMTS v. 4.6 [152]. Для видовой делимитации использован алгоритм GMYC [151].

Положения, выносимые на защиту

1. Митохондриальный геном реликтовых пиявок *Acanthobdella peledina*, вида широко распространенного в Северной Евразии, содержит уникальные структурные элементы в виде тандемных повторов, размер которых варьирует у образцов из географически разрозненных мест обитания.

2. Реконструкция эволюционной истории акантобделлид при использовании полных митохондриальных геномов демонстрирует стабильную топологию филогенетических деревьев и доказывает происхождение реликтовых пиявок от олигохетного предка в качестве сестринской линии истинных пиявок.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается согласованностью структур реконструированных В ланной работе митохондриальных геномов со структурами ранее опубликованных для других представителей класса Clitellata. Отдельная часть работы посвящена изучению использованных И параметров влияния данных начальных анализа на эволюционных отношений. Результаты работы были стабильность схемы опубликованы в рецензируемых изданиях и доложены на научных конференциях.

Апробация результатов исследований

Материалы диссертационной работы предствлены:

на Ежегодной научно-теоретической конференции. Биолого-почвенный факультет Иркутского Государственного Университета (Иркутск, 2017);

на 5-ой международной конференции "Molecular Phylogenetics and Biodiversity Biobanking (MolPhy-5)", Москва, 2018;

на 14-ой международной конференции "International Symposium on Aquatic Oligochaeta (ISAO-2018)", Хиросаки, Япония, 2018;

на 11-ой международной школе молодых учёных "Системная биология и Биоинформатика (SBB-2019)", Новосибирск, 2019;

на 12-ой международной мультиконференции по "Биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS/SB-2020)", Новосибирск, 2020;

на 12-ой международной школе молодых учёных "Системная биология и Биоинформатика (SBB-2020)", Ялта-Севастополь, 2020;

на 4-ой всероссийской конференции с международным участием «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии», Улан-Удэ, 2021.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 статей в научных журналах, включенных в список ВАК и приравненных к ним (в зарубежных и российских журналах системы Web of Science – 4) и 7 статей в сборниках научных трудов по материалам конференций международного и национального уровня:

1. Болбат А.В., Кайгородова И.А., Букин Ю.С., Федорова Л.И., Сороковикова Н.В. Применение биоинформационных методов для определения границ видов пиявок рода Erpobdella. Известия Иркутского Государственного Университета. Серия «Биология. Экология»2017; 20: 3-13. (РИНЦ)

2. Болбат А.В., Сороковикова Н.В., Кайгородова И.А. Оценка эффективности использования митохондриального маркера 12s для реконструкции филогении акантобделлид. Генетика 2019; 55: 1461-1465. (РИНЦ)

Bolbat A.V., Sorokovikova N.V., Kaygorodova I.A. Assessing Efficiency of the Mitochondrial 12S Marker Fragment for the Use in Reconstruction of the Phylogeny of Acanthobdellids. Russian Journal of Genetics 2019; 55: 1554-1558 (WoS)

3. Kaygorodova, I., Bolbat N., **Bolbat A**. Species delimitation through DNA barcoding of freshwater leeches of the *Glossiphonia* genus (Hirudinea: Glossiphoniidae) from Eastern Siberia, Russia. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 2019; 58: 1437-1446. (WoS)

4. **Bolbat A.**, Vasiliev G., Kaygorodova I. The first mitochondrial genome of the relic *Acanthobdella peledina* (Annelida, Acanthobdellida). Mitochondrial DNA Part B: Resources 2020; 5: 3300-3301. (WoS)

5. **Bolbat A.**, Matveenko E., Dzyuba E., Kaygorodova I. The first mitochondrial genome of *Codonobdella sp.* (Hirudinea, Piscicolidae), a new endemic leech species from Lake Baikal, Russia and reassembly of the *Piscicola geometra* data from SRA. Mitochondrial DNA Part B: Resources 2021; 6: 3112-3113. (WoS)

6. Болбат А.В., Кайгородова И.А., Букин Ю.С. Применение биоинформационных методов в молекулярной экологии. Вестник Иркутского университета 2017; 20: 39-40.

7. Mandzyak N.B., Kaygorodova I.A., **Bolbat A.V.** DNA barcoding of Eastern Siberian flat leeches (Hirudinea: Glossiphoniidae). Материалы 5-ой межд. конф. «Molecular Phylogenetics and Biodiversity Biobanking»; Москва, 2018; С. 93.

8. **Bolbat A.**, Sorokovikova N., Kaygorodova I. Estimation of 12s marker fragment effectiveness for ancient phylogeny reconstruction. Материалы 11-ой межд. школы молодых учёных «Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2019)»; Новосибирск, 2019; С. 10.

9. Bolbat N., **Bolbat A.**, Kaygorodova I. DNA barcode-based delimitation of the *Glossiphonia* species. Материалы 11-ой межд. школы молодых учёных «Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2019)»; Новосибирск, 2019; С. 11.

10. **Bolbat A.**, Vasiliev G., Kaygorodova I., Bogdanova V. New data on Acanthobdellida phylogeny based on complete mitochondrial genomes. Материалы 12ой межд. мультиконференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020)»; Новосибирск, 2020; С. 202-203.

11. Болбат А.В., Болбат Н.Б., Васильев Г.В., Богданова В.С. Матвеенко Е.Ю., Кайгородова И.А. Эффект использования полных митохондриальных геномов и их

отдельных фрагментов для делимитации видов. Материалы 12-ой межд. школы молодых учёных «Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2020)»; Ялта-Севастополь, 2020; С. 65.

12. Болбат А.В., Кайгородова И.А. 170 лет изучения реликтовых паразитов: итоги и актуальные вопросы. Материалы 4-ой всерос. конф. с международным участием «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии»; Улан-Удэ, 2021; С. 76.

Личный вклад

работы Автором выполнены основные этапы исследования: экспедиционные работы по сбору образцов акантобделлид, морфологический ДНК, сборка контигов¹ И экстракция тотальной аннотация анализ, митохондриального генома, филогенетический анализ, а также подготовка и публикация полученных результатов; разработана компьютерная программа для поиска прочтений с определённой последовательностью в необработанных данных секвенирования нового поколения. Выводы сделаны на основе собственных данных.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка литературы и четырнадцати приложений. Работа изложена на 137 страницах, включая приложения, содержит 29 рисунков и 12 таблиц. Список цитируемой литературы включает 200 источников, из которых 189 зарубежных.

Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках грантов № 17-2905097, № 19-34-50072 и № 19-34-90011. Секвенирование проводилось в секторе геномных исследований Института Цитологии и Генетики СО РАН. Часть работ по сборке митохондриальных последовательностей выполнена с использованием мощностей центра коллективного пользования "Сибирский суперкомпьютерный центр СО

¹ Контиги – наборы выравненных перекрывающихся прочтений.

РАН". Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Кайгородовой И.А. за руководство на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор признателен В. В. Тараканову, главе тунгуской общины Киренского района Иркутской области, за помощь в организации экспедиционных работ в труднодоступных районах Ленского бассейна, к.б.н. Батуриной М. А. (Инситут биологии Коми НЦ, Сыктывкар) и доктору П. Святеку (Силезский университет, Катовице, Польша) за содействие в получении образцов европейских акантобделлид, коллегам из Института Цитологии и Генетики СО РАН (Новосибирск) к.б.н. Васильеву Г. В. и д.б.н. Богдановой В. С. за содействие в секвенировании и сборке митохондриальных геномов, а также коллегам из Лимнологического института СО РАН к.б.н. Букину Ю.С. за консультации по применению методов филогенетического и статистического анализа, к.б.н. Е. В. Дзюбе за предоставленный биологический материал акантобделлид из р. Ия и р. Барбитай и байкальских глубоководных гирудинид, Сороковиковой Н. В. за ценные советы по работе с ДНК и уникальные образцы камчатского вида. Отдельную благодарность автор выражает своей супруге Болбат Н.Б. 3a бесценную помощь и вдохновение на осуществление этой работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современное состояние знаний о реликтовых пиявкоподобных паразитах 1.1.1 Общая характеристика и морфологические особенности акантобделлид

Кольчатые черви (Annelida) являются одним из типов царства животных (Animalia). Аннелиды традиционно подразделяются на два класса современных колчецов – многощетинковые черви (Polychaeta) и поясковые черви (Clitellata) и Machaeridia, класс включающий исключительно вымершую группу сегментированных кольчатых червей, обитавших на Земле от раннего ордовика до каменноугольного периода [190], а также отряд Myzostomida, положение которого в системе Annelida не ясно [22]. Отличительными особенностями класса Clitellata является наличие у них специального органа – пояска – образующего слизистый кокон, питающий оплодотворённые яйца до вылупления, а также малое количество щетинок на сегмент или их полное отсутствие [4]. Традиционно класс Clitellata подразделяется на два подкласса: малощетинковые черви (Oligochaeta), в большинстве своём являющиеся донными детритофагами, и пиявок (Hirudinea: Rhynchodellida и Arhynchobdellida), являющихся эктопаразитами или хищниками [9, 160]. К классу Clitellata причисляются две группы пиявкоподобных червей incertae sedis (имеющих неопределенное положение): Branchiobdellida И Acanthobdellida.

Отряд Branchiobdellida объединяет в себе облигатных эктосимбионтов ракообразных [4, 65]. Они обитают в Северном полушарии в трех отдельных областях: в Восточной Азии, Европейско-Средиземноморском регионе, а также в Северной Америке, где зарегистрировано наибольшее разнообразие (107 видов) [66]. Распространение североамериканских бранхиобделлид охватывает большую часть умеренной Неарктики и северной неотропической зоогеографической области. В Палеарктике обитают 45 видов, 37 из которых встречаются в Восточной Азии [66].

Acanthobdellida – отряд холодолюбивых пиявкоподобных червей, являющихся эктопаразитами арктических лососеобразных рыб (Salmoniformes).

Его представители являются реликтами [72] как с точки зрения таксономии, являясь единственными представителями древних пиявкоподобных паразитов, так и с точки зрения биогеографии, поскольку их ареал ограничен отдельными регионами, совпадающими с географией распространения ледников во времена плейстоценового оледенения [7]. В состав отряда входят два вида: *Acanthobdella peledina* и *Paracanthobdella livanowi* [4].

Интерес к группе возник в связи с необычным мозаичным сочетанием в них морфологических и анатомических особенностей, присущих малощетинковым червям, и черт, характерных для пиявок. К олигохетным признакам акантобделлид относятся почти цилиндрическая форма тела, латеральная нервная система, метамерная целомическая полость вокруг кишечного канала и отсутствие выраженной передней присоски (Рисунок 1). Однако главным признаком, роднящим акантобделлид с малощетинковыми червями, является наличие пяти рядов парных крючкообразных щетинок на первых пяти сомитах переднего конца тела. Назначение щетинок достоверно неизвестно, однако ОДНИМ ИЗ предположений является их необходимость для прикрепления к телу жертвы, а также их использование для передвижения. В то же время акантобделлиды обладают и рядом эколого-морфологических признаков, роднящих их с пиявками. К таким признакам относятся эктопаразитический образ жизни, наличие задней присоски, хоть и примитивного строения (перпендикулярной оси тела), а также репродуктивного аппарата, сходного по строению с аппаратом пиявок. Данная комбинация черт вызвала дискуссию касательно таксономического положения.

Исторически первым видом, представляющим отряд Acanthobdellida, стал вид *Acanthobdella peledina*, вкратце описанный в 1850 году немецким зоологом А. Грубе [70], получившим образцы из р. Енисей, собранные во время сибирской экспедиции А. Ф. Миддендорфа [131]. В 1896 вышли статьи русского биолога А. О. Ковалевского, где он описал полученные им заспиртованные образцы *A. peledina* из оз. Онега, дополнив описание вида деталями его анатомии [102, 103].



Рисунок 1 – Внешняя морфология *A. peledidna* (1, 2) и *P. livanowi* (3, 4) по Эпштейну [10].

Полное описание виду А. peledina дал Н. А. Ливанов, в 1905 году опубликов монографию с подробным описанием морфологии, биологии и экологии вида [3], которая ввиду ее значимости была переведена на немецкий и опубликована годом позже [119]. Будучи прозорливым зоологом, Н. А. Ливанов сразу обратил внимание на странное сочетание примитивных олигохетных черт и эволюционно более продвинутых признаков гирудиней и выдвинул гипотезу о том, что A. peledina является промежуточным звеном эволюции между малощетинковыми червями и пиявками. В это же время произошла ошибка в датировке вида. Свою монографию Н. А. Ливанов назвал "*Acanthobdella peledina* Grube, 1851". поскольку ознакомился с первоописанием вида, опубликованным в России в 1851 году [131]. Ввиду масштабности и доскональности монографии Н. А. Ливанова, она на многие годы стала основным источником информации об этом виде, из-за этого ошибка в дате описания вида оставалась незамеченной вплоть до 2006 года [104], однако до сих пор неверная датировка вида A. peledina кочует из публикации в публикацию.

Еще одним представителем отряда Acanthobdellida стал найденный в материалах из пресных водоемов п-ова Камчатка и описанный в 1966 году

советским зоологом В. М. Эпштейном вид Acanthobdella livanowi [10]. В названии данного вида В. Эпштейн отдал дань уважения автору фундаментальной работы о От A. peledina вид отличается первом представителе отряда. меньшими размерами, жёлто-зелёной окраской и хоть и примитивной, но гораздо более оформленной передней присоской. Впоследствии В. Эпштейн выделил открытый Paracanthobdella семейства ИМ вид В отдельный род отдельного Paracanthobdellidae [11]. Столь серьезные таксономические перестановки до сих пор не находят научного обоснования. Однако таксономический статус Paracanthobdella livanowi до сих пор остается неоспоренным ввиду отсутствия четких критериев рода и таксонов более высокого ранга в систематике.

Тело акантобделлид имеет веретеновидную форму, более утолщённую к задней части, чем к передней [3, 10]. Впрочем, этот признак плохо различим на живых экземплярах и становится намного заметнее при фиксации. Размеры тела сильно варьируют от состояния особи: в спокойном состоянии *A. peledina* достигают 37,5 мм в длину и 6 мм в ширину; максимальный зафиксированный размер *P. livanowi* составляет 21,9 мм в длину и 4 мм в ширину [21]. При движении акантобделлиды могут растягиваться, и судить об их размерах сложно. Помимо этого, размеры тела варьируют в зависимости от времени сбора акантобделлид: от лета к осени размеры и масса тела значительно увеличиваются, что, по-видимому, связано с циклом размножения хозяев, поскольку, вероятнее всего, заражение рыбы происходит во время нереста.

Передний конец тела *A. peledina* сужен и слегка уплощён в дорзовентральном направлении, что более заметно на живых экземплярах. У *P. livanowi* передний конец тела расширен и формирует примитивную, но обособленную ложковидную присоску (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Внешняя морфология *А. peledina* (1 – организм целиком, 2 – головная лопасть) по Phillips et al. [150] и *P. livanowi* (3 – организм целиком, 4 – головная лопасть) по Utevsky et al. [187].

Оба вида имеют на головном сегменте три пары глаз, которые различимы только на живых экземплярах. При фиксации окраска глаз мгновенно теряется, и они становятся неразличимы [4].

Окраска живых образцов описывается по-разному. Для *A. peledina* самой распространённой является зелёная окраска с тёмной поперечной исчерченностью по числу сомитов, однако встречаются и серовато-зелёные, буровато-серые и серокрасноватые особи [4, 94, 95]. Окраска *P. livanowi* варьирует меньше и описывается как жёлтая с тёмно-зелёными полосами [11].

Щетинки двух видов различаются по длине и форме. Для вида *A. peledina* они длиннее и имеют почти прямую форму от основания до крючковидного кончика, с небольшим утолщением посередине. У *P. livanowi* они намного короче и изогнуты в противоположную от крючковидного конца сторону в районе утолщения [11].

Список морфологических различий видов представлен в таблице 1.

Признак \ Вид	A. peledina	P. livanowi
Макс. длина тела	37,5 мм	21,9 мм
Макс. ширина тела	6 мм	4 мм
Передний конец тела	Веретеновидно сужен или слегка уплощён в дорзовентральном направлении	Уплощённый или ложковидный, инвагинация у глотки напоминает присоску
Окраска	Тёмно-зелёная, серовато- жёлтая, серовато-коричневая	Жёлтая с тёмно-зелёными поперечными полосами
Щетинки	Одинаковой длины, длинные и прямые, крючковидные на конце	Разной длины, короткие и выгнутые посередине в направлении, противоположном крючковидному концу

Таблица 1 – Морфологические отличия видов акантобделлид

1.1.2 Ареал обитания и хозяева

Ареал обитания акантобделлид ограничен насыщенными кислородом олиготрофными водоёмами севера Евразии. Вид A. peledina имеет общирный ареал и обитает на территории от Норвегии на западе до полуострова Чукотка на востоке (Рисунок 3). Анализируя ареал обитания A. peledina, H. M. Пронин в 1971 году указывал, что Кольско-Фенноскандинавский и Европейско-Сибирский ареал разделены бассейном р. Северной Двины, где они не обнаружены [7]. До настоящего времени бассейн Северной Двины остается terra incognita в отношении филогеографии акантобделлид (Рисунок 3). На сегодняшний день самым южным районом обнаружения A. peledina является р. Барбитай, приток Ангары (Иркутская область) [95]. Помимо этого, отмечено, что филогеография акантобделл не случайно вписывается в границы распространения многолетней мерзлоты (Европейско-Сибирский регион) области И формирования плейстоценовых материковых льдов (Кольско-Фенноскандинавский регион) [7].



Рисунок 3 – Ареал обитания акантобделлид в палеарктической области с указанием исторических точек сбора [3, 5, 7, 8, 10, 11, 94, 187]. Красным отмечен ареал *А. peledina*, синим – *P. livanowi*.

Ареал вида *P. livanowi* ограничен пресными водоёмами Камчатки и Чукотки (рис. 3) [10, 11, 187]. В литературе имеются сведения о местах, где ареалы двух видов пересекаются – р. Анадырь и озёра вблизи 105-108 километра трассы Амгуэма-Иультин (Чукотский Автономный Округ) [4]. Стоит, однако, отметить, что *A. peledina* указана для р. Анадырь ленинградскими паразитологами в 1948 году [1], что на 18 лет раньше описания *P. livanowi*. В связи с этим, есть вероятность ошибки в идентификации, поскольку всех чукотских акантобделлид в то время именовали *A. peledina*, однако перепроверить морфологию тех образцов невозможно ввиду отсутствия коллекций. Тем не менее, известный специалист по пиявкам Е. И. Лукин [4] утверждал, что на Чукотке *A. peledina* встречается реже, чем в ряде других мест своего ареала, из-за серьезной конкуренции с *P. livanowi*.

Единичные находки свидетельствуют о существовании акантобделлид в водоёмах Аляски. Первая такая находка представляла собой мелкий (3-5 мм) яркокрасный образец из донных отложений озера Чандлер. Несмотря на неполовозрелость, он был определён как *А. peledina* [83]. Однако ярко-красный цвет образца не подходит под классическое описание вида, что может свидетельствовать в пользу ошибки идентификации. Чуть позднее *A. peledina* была зарегистрирована на ряпушке (*Coregonus sardinella*) в ходе исследований рыбных ресурсов в реке Чипп и безымянном озере в 200 км юго-восточнее г. Барроу, США. Цвет и размеры этих образцов соответствовали типовым [75].

На сегодняшний день известно 30 видов рыб (Salmoniformes), на которых паразитируют акантобделлы, из них 24 вида являются хозяевами *A. peledina* [94], а *P. livanowi* паразитирует на 6 видах рыб (преимущественно гольцов) [187]. Видыхозяева относятся к отряду лососеобразных рыб (Salmoniformes). Среди них представители семейств Salmonidae (14 видов), Coregonidae (10 видов), Thymallidae (5 видов). Исключение составляет указанный единожды вид *Lota lota*, относящийся к тресковым (Gadiformes). Все хозяева являются речными, озёрноречными и полупроходными видами, среди них отсутствуют полностью озёрные представители. Помимо этого, в литературе встречается упоминание, что *A. peledina* паразитирует на камбале (*Scophthalmus maximus*) [75], однако это, по всей видимости, является ошибкой, поскольку в оригинальном источнике, на который ссылаются авторы, такая информация отсутствует [2]. Акантобделлиды являются исключительно пресноводными организмами и, в отличие от своих хозяев, не встречаются в солёных или солоновато-водных водоёмах [3, 11].

Ареал акантобделлид значительно уже, чем у видов-хозяев, это может указывать на то, что в отличие от них пиявкоподобные паразиты являются ледниковыми реликтами «консервативного» типа, поскольку сохранились в водоемах с условиями, близкими к первоначальным [7].

Лимитирующие факторы распространения акантобделлид остаются не до конца ясными. Пронин считал, что на распространение акантобделлид влияет их реофильность (приспособленность к жизни в текущих и насыщенных кислородом водах) [8]. Однако акантобделлиды были обнаружены в озёрах Ладожском, Онежском, Вашуткинском, Большой Харбей, Фролиха, Леприндокан, Довочан, Лабынкыр, Ажабачье, а также в нескольких безымянных озёрах. В связи с этим, проточная вода, вероятно, не является необходимым экологическим фактором для

выживания и размножения акантобделлид. Гораздо более вероятным фактором может служить численность, плотность и нерестилища хозяев. Заражение рыб акантобделлидами, вероятнее всего, происходит в период нереста, поскольку они не встречаются на молодняке [8]. Это подтверждается исчезновением *A. peledina* в Ладожском и Онежском озёрах, а также в зарегулированных водоёмах Швеции, где численность хозяев сократилась в связи с выловом и эвтрофикацией [41, 94].

1.1.3 История изучения эволюции акантобделлид

Эволюционное положение акантобделлид вызывало бурные дискуссии на протяжении всего XX века. Изначально Грубе [70] отнес их к пиявкам. После всестороннего исследования Н. А. Ливанов подтвердил вывод о систематическом положении акантобделл в пределах Hirudinea, одновременно показав, что морфологические признаки пиявок развиты у них слабее, чем у типичных пиявок, и по сравнению с последними их строение весьма примитивно [3]. Однако В. Михельсон, известный специалист по олигохетам, рассматривал акантобделл как особое семейство малощетинковых червей, а все пиявочные черты посчитал конвергентно развитыми адаптациями к паразитическому образу жизни [130]. Несостоятельность точки зрения Михельсона на происхождение акантобделл была показана Н. А. Ливановым в 1931 году в работе, посвященной происхождению пиявок [120]. В дальнейшем эволюционное положение акантобделл не давало покоя большинству систематиков, что выразилось в многолетней дискуссии и многократной переработке систематики кольчатых червей, где ключевым вопросом оставалось положение акантобделл.

Важным вопросом при изучении эволюции акантобделлид является положение ещё одной родственной группы кольчецов из отряда Branchiobdellida – симбиотических червей пресноводных ракообразных. Проблема возникла ввиду того, что бранхиобделлиды не несут щетинок и имеют чётко различимую заднюю присоску, но при этом их репродуктивный аппарат более сходен с олигохетным. Акантобделлиды, напротив, имеют репродуктивный аппарат более сходный с пиявочным, однако несут на переднем конце тела щетинки, а их задняя присоска

перпендикулярна оси тела, что считается примитивным признаком. Таким образом, пиявкоподобные черты одной из групп должны были развиться конвергентно, чтобы предполагать более удалённое её родство с пиявками. В 1993 году немецкие исследователи [153] провели доскональный анализ внешней и внутренней анатомии A. peledina с использованием методов световой И электронной микроскопии. Применив метод максимальной экономии (MP) к исследуемым морфологическим чертам, они построили два равновероятных сценария эволюции. Обе гипотезы объединяло то, что сестринской группой Euhirudinea являлись Acanthobdellida, но они различались положением отряда Branchiobdellida: равновероятным для него оказалось положение как внутри клады олигохет, так и в качестве сестринской группы Acanthobdellida и Euhirudinea. Кладограмму, при которой отряд Acanthobdellida является сестринским для объединённой клады Branchiobdellida и Euhirudinea, авторы сочли недостоверной, приняв как более приемлемую гипотезу 0 конвергентной адаптации бранхиобделлид к эктопаразитическому образу жизни [153]. Данный взгляд был поддержан Р. Бринкхерстом в 1999 [31], который отметил, что челюсти бранхиобделлид явно имеют иное строение и происхождение, нежели челюсти безглоточных пиявок, как и передняя присоска. Кроме того, в пользу версии о конвергентном развитии бранхиобделлид говорило то, что их задняя присоска имеет иное строение, используя для прикрепления секрецию клейких веществ, в отличие от присоски Hirudinea [31]. Врочем, М. Сиддалл и др. в 2001 году [172] оспорили это утверждение, указав, что идея о различном строении задней присоски выдвигалась уже неоднократно, однако микроскопические исследования показали одинаковые типы клеток эпидермиса и наличие сходных желёз в присосках обеих групп. Косвенным свидетельством базального положения бранхиобделлид по отношению к общей кладе акантобделлид и пиявок служит также и то, что первые являются симбионтами исключительно пресноводных ракообразных. Экологические же роли гирудинид разнообразны и варьируют от паразитизма на позвоночных и беспозвоночных до хищничества. Среди гирудинид есть лишь одна группа байкальских эндемичных рыбьих пиявок, являющихся

паразитами ракообразных (амфипод), принадлежащих родам *Codonobdella* и *Baicalobdella*, которые, вероятно, перешли на питание беспозвоночными вторично.

оставался об Неясным вопрос ЭВОЛЮЦИОННЫХ взаимоотношениях червей. эктопаразитических кольчецов И малощетинковых Традиционно считалось, что наиболее вероятным кандидатом на предковость акантобделлидам и гирудинидам являются люмбрикулиды вида Agriodrilus vermivorus [130]. Причиной тому является частое упоминание о редукции целома на переднем конце тела, а также наличие мощной мускульной глотки. После того, как был открыт другой род хищных люмбрикулид – Phagodrilus – возник вопрос о возможном его родстве с пиявками и пиявкоподобными паразитами. Более тщательное анатомическое исследование показало, что ни у Agriodrilus, ни у Phagodrilus нет редуцированного целома, как и каких-либо иных неоспоримых свидетельств близкого родства хотя бы одной из этих групп пиявкам и пиявкоподобным паразитам [30].

образом, классификация Таким поясковых кольчецов на основе морфологических данных зашла в тупик, что подтолкнуло к мысли о необходимости применения молекулярно-генетических методов. В то время как морфологические сходства можно объяснить конвергентными адаптациями к эктопаразитическому образу жизни, чёткую корреляцию молекулярной эволюции с образом жизни и занимаемой экологической нишей выявить значительно сложнее. Первая попытка применить молекулярные методы к разрешению вопросов эволюции акантобделлид была выполнена в 1998 году на основе маркерного участка митохондриального гена *cox1* с использованием алгоритма экономии (MP). В результате было максимальной реконструировано филогенетическое древо, в котором акантобделлиды образовали сестринскую кладу общей кладе бранхиобделлид и гирудинид [171], то есть, получена та самая схема, которую предыдущие исследователи сочли необоснованной [153]. Полученное древо имело значительные расхождения с принятой на тот момент систематикой, и авторы исследования отметили, что остаются скептично настроенными к своим результатам [171]. Позже молекулярные данные из этого

исследования были дополнены данными о морфологии червей и структуре ядерного гена 18S рибосомальной РНК [17]. Древо, построенное на основе объединённых данных (18S + морфология), имело более высокое разрешение, однако повторяло предудущую неудовлетворяющую схему кластеризации [171]. Параллельно с этим другая группа исследователей при использовании МР-анализа генов 18S и 12S без привлечения морфологических данных получила кардинально отличную схему кластеризации [185]. Основное отличие результата данной работы состояло в том, что акантобделлиды и бранхиобделлиды формировали монофилетичную кладу, сестринскую кладе гирудинид. Монофилия единой клады Branchobdellida, Acanthobdellida и Hirudinea годом позже была подтверждена исследователей основе филогенетического третьей группой на анализа аминокислотных последовательностей фрагментов cox1 [127]. В той работе древо, построенное по более совершенному методу максимального правдоподобия (ML), показало кластеризацию акантобделлид с бранхиобделлидами в одну кладу, однако положение этой клады в общей системе Clitellata было нестабильно в зависимости от использованного программного обеспечения [127].

Работы, выполненные на рубеже XXI века, имели потенциал стать хорошим заделом для решения вопросов эволюции класса Clitellata, однако в них был получен ряд противоречивых и не согласующихся с морфологическими данными выводов (Рисунок 4). Объяснение части полученных аномальных результатов было опубликовано в 2001 году [128]. Автор этой работы указал на загрязнение молекулярных данных, на основе которых ранее были опубликованы результаты трёх научных работ [17,128, 171]. Кроме того, критике подверглась сама методика обработки ранних молекулярных данных [128]. Автор указал на недостаточное таксономическое разнообразие в наборе данных, в частности, на отсутствие семейства Lumbriculidae как олигохет потенциальной предковой линии относительно пиявок и пиявкоподобных червей, а также объяснил причины искажения филогенетических схем высокими и неоднородными скоростями эволюции в разных линиях, которые не учитываются при МР-анализе. На основе гена 18S методами ML и MP были подтверждены сестринские отношения

акантобделлид и гирудинид, в то время как позиция клады бранхиобделлид была нестабильна и слабо поддержана [128]. Параллельно с этим загрязнение, приведшее к искажению результатов филогенетического анализа, признали и авторы опубликованных последовательностей, что вновь подняло вопрос о пересмотре полученных результатов [172]. Несмотря на использование новых 18S последовательностей генов cox1 И бо́льшую И таксономическую представленность, выводы этой работы в части сестринских отношений клады акантобделлид общей кладе бранхиобделлид и гирудинид совпали с выводами предыдущей раскритикованной работы этого коллектива. Значения поддержек на консенсусном древе были довольно высоки. Помимо этого, авторы привели в поддержку своих результатов ряд ранних морфологических работ, однако сами не использовали эти данные из-за возможной неоднозначности их интерпретации [172]. Позже эти данные были обработаны таким же методом, и результат был воспроизведён, однако полученное древо являлось лишь кладограммой, не отражающей длину ветвей, и для узла, в котором происходит разделение клады акантобделлид с кладой гирудинид и бранхиобделид, Jackknife-поддержки были ниже 50% в ³/₄ экспериментов [52]. Использование другого фрагмента гена 18S, обработанного при помощи метода ML, показало иную кластеризацию: акантобделлиды сформировали сестринскую кладу гирудинидам, однако их положение относительно клады бранхиобделлид и люмбрикулид осталось неразрешённым [93]. В дальнейшем последовательности полного гена 185 были обработаны разными методами, включая MP, ML и BI (байесовский метод). Филогения, реконструированная по МР, показала кластеризацию акантобделид как сестринской ветви люмбрикулид, однако узлы, в которых происходит расхождение этих групп, имеют статистические поддержки ниже 70% [161], что недостаточно для разрешения ветвления [78]. В последующие годы было обнаружено, что ещё несколько последовательностей бранхиобделлид, использованных в ранних работах [65, 172], содержат загрязнения или выделены из неверно определённых образцов [192]. Эти и другие ошибки были признаны авторами в новой работе, в которой они использовали фрагменты митохондриальных (cox1 и 16S) и ядерных

(18S, 28S и ITS) генов для реконструкции мультилокусной филогении. Выводы ML- и ВІ-деревьев с высокими поддержками подтвердили сестринские отношения акантобделлид и гирудинид с их общей кладой сестринской бранхиобделлидам. Результаты реконструкции по методу МР отличались, однако узлы на этом древе поддержки, И искусственное установление филогении, имели низкие согласующейся с двумя другими методами, не привело к статистическизначимому увеличению длины древа [184]. Наиболее масштабный анализ филогении на сегодняшний день использовал 301 генетический локус общей 55 502 длиной нуклеотида [150]. В этой работе авторы подтвердили кластеризацию акантобделлид в одну кладу с гирудинидами, сестринскую бранхиобделлидам. Помимо этого, авторы провели оценку традиционно используемых генетических маркеров (cox1, 12S, 16S, 18S, 28S, и ITS1) и обнаружили их крайне низкую эффективность в разрешении филогенетических отношений на уровне отрядов, даже при использовании конкатенированных данных, ввиду насыщения заменами [150]. Кладограммы, опубликованные в различных публикациях на сегодняшний день, суммированы на рисунке 4.

Большинство опубликованных работ по молекулярной филогении, начиная с 1998 года, поддерживают парафилию Oligochaeta и гипотезу, выстроенную на основе морфологических данных [3, 30, 130], о том, что олигохеты семейства Lumbriculidae являются наиболее близкой филогенетической линией к предковой группе, общей для ветви акантобделлид, бранхиобделлид и гирудинид. Замечено, что в тех исследованиях, в которых использованы корректные данные о тех или иных фрагментах генома [128, 150, 184, 185], получены филогенетические схемы, наиболее соответствующие современным представлениям об эволюционных взаимоотношениях поясковых кольчецов (Clitellata).



Схематизированные Рисунок кладограммы червей, 4 кольчатых морфологических полученные на основе (выделено серым фоном) И молекулярных данных. Ссылки на работы приведены под каждой схемой. Обозначения таксонов: О – Oligochaeta, В – Branchiobdellida, A – Acanthobdellida, H – Hirudinea.

Таким образом, несмотря на множественные попытки разрешить эволюционное положение акантобделлид с применением как морфологических, и молекулярных данных, однозначной картины эволюции поясковых так получить Помимо фрагментированность и кольчецов не удалось. ЭТОГО, нестандартизированность использованных ранее данных подводят к необходимости применения более универсального генетического маркера, позволяющего получать воспроизводимые реконструкции древних эволюционных событий.

1.2 Митохондриальный геном животных

1.2.1 Структура митохондриального генома животных

Митохондрии – это двумембранные органеллы, выполняющие функцию центра кислородного дыхания большинства эукариотических клеток. Структурно митохондрия состоит из наружной мембраны, обтягивающей множественные плотные складки замкнутой внутренней мембраны, называемые кристами. Пространство, ограниченное внутренней мембраной, называется матриксом митохондрий. В нём происходят процессы цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса) и окислительного фосфорилирования, в ходе которого за счёт энергии созданного ферментами дыхательной цепи протонного градиента между матриксом и периплазматическим пространством из молекул АДФ и фосфорной кислоты синтезируются молекулы АТФ. Помимо этого, в митохондриальном матриксе располагаются белки, необходимые для репликации митохондрий, рибосомы и тРНК, а также собственный генетический материал митохондрий, упакованный в компактные мембраносвязанные структуры – нуклеоиды [67].

Согласно главенствующей на сегодняшний день гипотезе, митохондрии эукариотической появились на ранних этапах эволюции клетки путём альфа-протеобактерий эндосимбиоза ранних предков современных Rickettsia Wolbachia внутриклеточных паразитов родов — И c [126]. После эндосимбиоза протоэукариотической клеткой геном протомитохондрий значительно редуцировался, сохранив в себе лишь гены компонентов дыхательной цепи и гены, отвечающие за правильную реализацию митохондриального генетического кода. В митохондриях животных было обнаружено более 1000 белков, из которых лишь 13 кодируются их собственным геномом [146]. Таким образом, практически все митохондриальные белки импортируются из цитоплазмы и направляются в митохондрии либо после трансляции, благодаря терминальным сигнальным последовательностям, либо в процессе трансляции вблизи внешней мембраны митохондрий [47]. Полному переносу всех митохондриальных генов в ядерный геном препятствует ряд факторов. Митохондрии большинства таксонов используют генетический код,

отличный от ядерного [180]. Инициация и терминация транскрипции ядерных генов происходит под контролем множества нуклеотидных участков и белковых факторов, чаще регулирующих транскрипцию генов по отдельности [12], тогда как транскрипция митохондриального генома приводит к синтезу единой молекулы РНК для всех генов с последующим её процессингом [115]. Функциональный перенос генетического материала из митохондрий в ядро требует не смены формирования только генетического кода, но И соответствующих регуляторных участков в ядерном геноме. Также белоккодирующая последовательность гена должна содержать в себе терминальную последовательность, необходимую для транспорта продукта в митохондрии. Кроме того, выраженная гидрофобность белковых продуктов митохондриальных генов препятствует их импорту в митохондрии после трансляции [64, 143]. Тем не менее, прослеживается тенденция к централизации генетической информации эукариот В И вероятно, что необходимость В существовании ядре, митохондриального генома с течением времени исчезнет полностью [29]. Отдельные митохондриальные могут кодировать терминальные гены последовательности, необходимые для импорта их продукта в митохондрию, ещё до переноса соответствующих генов в ядро, что может облегчить процедуру этого переноса [186].

Каждая митохондрия содержит несколько копий своего генома, а обычная соматическая клетка содержит в среднем около 100 митохондрий [167]. Их количество, однако, сильно зависит от размеров клетки, её назначения и уровня метаболизма. Так, клетки печени могут содержать 1-2 тысячи митохондрий, а ооцит – 10^4 - 10^5 [12].

Классические представления о структуре митохондриальной ДНК многоклеточных животных сложились в 1981-1984 годах. Первой была расшифрована первичная структура митохондриального генома человека как наиболее актуального организма с биомедицинской точки зрения [14]. Размер секвенированного генома составил 16 569 пар оснований и имел топологию замкнутого кольца. В последовательности было аннотировано 37 генов, включая

13 белок-кодирующих участков, два гена рибосомальной РНК и 22 гена транспортных РНК. Параллельно с этим изучался и геном другого немаловажного организма, используемого в биомедицинских исследованиях в качестве модели для изучения патологических процессов – домовой мыши (Mus musculus). Публикация этого генома происходила в несколько этапов с 1979 по 1983 годы, в результате чего консенсусный геном был собран на основе данных нескольких публикаций. Оба организма практически одинаковый имеют размер митохондриального генома и одинаковый набор и порядок генов. Такое сходство привело к предположению о высокой консервативности генетического материала митохондрий. Позже был секвенирован митохондриальный геном ещё одного модельного организма, популярного в генетических работах – плодовой мушки Drosophila yakuba [40]. Несмотря на более чем пол миллиарда лет независимой эволюционной истории [148], структуры митохондриальных геномов позвоночных (человек, мышь) и беспозвоночных (мушка) оказались невероятно схожи, не считая изменённого порядка генов. Секвенированный позже митохондриальный геном дождевого червя Lumbricus terrestris показал сходный набор генов и длину генома для представителя другого крупного таксона беспозвоночных - типа Annelida [24]. Данный факт окончательно утвердил представление 0 митохондриальной ДНК животных как о маленькой (около 16 тыс. п.н.) кольцевой молекуле с консервативным набором генов. Большинство секвенированных на сегодняшний день митохондриальных геномов животных совпадают с этим описанием.

Тем не менее, за годы исследований был обнаружен ряд исключений, включая геномы линейной топологии и геномы, состоящие из пары или множества кольцевых молекул с неодинаковым набором генов, а также организмы, полностью утратившие митохондрии [176]. Однако существуют свидетельства наличия большого разнообразия ранее неизученных структур и топологий митохондриальных геномов. На 2016 год около 97% геномов митохондрий в международных базах генетических данных принадлежали двустороннесимметричным животным (Bilateria), и большая их часть была довольно консервативна. В то же время, сведений о структуре генетического материала митохондрий других групп царства животных остаётся крайне мало. Однако из уже имеющихся данных стало очевидно, что стрекающие (Cnidaria) и губки (Porifera) обладают обширным разнообразием ранее не встречавшихся структур, включая дополнительные гены, большую вариабельность по числу генов тРНК, более 7 генетических кодов, интроны, системы редактирования тРНК и мРНК, фрагментированные рибосомальные гены, а также значительную вариабельность в размерах нуклеотидных последовательностей [111].

В 1983 году была описана группа организмов, которые, как казалось, не имеют митохондрий. Парафилетическая группа облигатных внутриклеточных паразитов с таким характерным признаком была названа Archezoa, поскольку отсутствие митохондрий сочли архаичным признаком, свидетельствующим о дивергенции этой группы до эндосимбиоза митохондрий с предком большинства эукариотических организмов [36, 37]. Однако более детальные работы по изучению клеточной биологии и филогении этих организмов выявили, что все они обладают мембранными органеллами митохондриального происхождения, частично или полностью утратившими митохондриальный геном и функции [50]. Гипотеза 0 происхождении этих структур вследствие отдельного события эндосимбиотического была отвергнута В свете результатов указывавшего на локализацию иммуноцитохимического анализа, В этих белков [79] И органеллах митохондриальных частичного сохранения митохондриального генома [27]. Часть обнаруженных структур ответственна за производство водорода, который используется внутриклеточными метаногенными симбионтами хозяев для восстановления углекислого газа и генерацию АТФ. Такие структуры были названы гидрогеносомами [118]. Помимо них были обнаружены структуры меньшего размера, которые не несут никакой функции, или их функция не была открыта, и которые в ряде случаев не имеют крист. Такие структуры были названы митосомами [39]. Среди инфузорий анаэробные виды с гидрогеносомами образуют полифилетичную группу, имеющую в своём составе аэробные виды, что указывает на неоднократную трансформацию митохондрий в

гидрогеносомы и лёгкость такого перехода [49]. Помимо меньших размеров и утраты функций, гидрогеносомы и митосомы также отличаются более короткими сигнальными последовательностями импортируемых белков, кодируемых ядерным геномом [175].

Ещё одной примечательной особенностью митохондриальных геномов многоклеточных животных является большое разнообразие порядка генов при высокой консервативности их набора [111]. Сходства в порядке генов не всегда коррелируют с эволюционной близостью организмов, а одинаковый порядок некоторых отдельных элементов может объединять дальнородственные В использование организмы. связи с ЭТИМ геномных перестановок В митохондриальной ДНК в качестве филогенетического инструмента не оправдано [164].

Несмотря значительный на прогресс изучении В структуры И функционирования митохондриального генома, ДО сих пор остаются неизученными детали реализации его информации. В 1998 две группы исследователей, изучая филогенетические отношения рептилий И ПТИЦ, гене третьей субъединицы NADH-дегидрогеназы обнаружили В вставку, сдвигающую рамку считывания [133, 199]. Такая же вставка встречается многократно в различных таксонах диапсид, что говорит о многократном и независимом её приобретении или утрате в ходе эволюции этой группы [15]. Однако по косвенным свидетельствам был сделан вывод, что данная вставка нетранслируемой является И не сказывается на аминокислотной последовательности. Механизм трансляциии, позволяющий пропускать данную вставку, остаётся неясен. Помимо этого, экспериментально доказано, что внутри митохондриального гена 16S человека и крысы кодируется функциональный белок, названный гуманин и раттин соответственно [33, 74]. Механизм регуляции и экспрессии гена, находящегося внутри другого гена, неизвестен.

1.2.2 Проблема аннотации митохондриальных геномов и теория тРНКпунктуации

В большинстве изученных организмов митохондриальная ДНК транскрибируется как единый полицистронный комплекс [115]. Незрелая матричная РНК содержит последовательности генов компонентов разной природы: белков, транспортных и рибосомальных РНК. Для дальнейшей реализации генетической информации митохондриального генома требуется произвести процессинг незрелой матричной РНК. Несмотря на малый размер митохондриального генома, детали механизма такого процессинга до сих пор остаются малоизученными, что может вызывать проблемы при попытке его аннотации *in silico*. Генная композиция митохондриального генома животных максимально компактизирована. Между генами, как правило, нет ни одного Более того, довольно часто встречаются свободного нуклеотида. случаи перекрытия кодирующих последовательностей генов [45, 137]. Поэтому для наиболее точной аннотации генов требуется знание тонкостей процессинга РНК. Поскольку митохондриальная ДНК не имеет регуляторных последовательностей перед началом каждого гена, становится проблематично аннотировать точный старт-кодон белок-кодирующих участков. Синтез любого белка с молекулы мРНК начинается с кодона, соответствующего метионину. Однако в митохондриальном геноме беспозвоночных животных метионину соответствуют два кодона: ATG и АТА. На сегодняшний день не существует достоверного способа предсказания истинного стартового кодона *in silico* [137].

Несмотря на наличие у всех белок-кодирующих генов в митохондриях многоклеточных животных стоп-кодонов, большинство из них перекрываются с нижестоящими генами транспортных РНК. В связи с этим возник вопрос о матричной РНК, синтезируемой процессинге незрелой В митохондриях. Картирование продуктов экспрессии митохондриальных генов клеток линии HeLa З'-концы мРНК, что зрелых молекул показало, кодирующих белки. непосредственно примыкают к 5'-концам генов нижестоящих генов тРНК, заканчиваясь полиаденилированием раньше предсказанного стоп-кодона [144].

Большинство белок-кодирующих митохондриальных генов непосредственно перед началом гена тРНК заканчиваются укороченными стоп-кодонами (Т- или ТА-). Данный факт привёл к формированию теории тРНК-пунктуации [145], согласно которой при процессинге незрелой РНК её разрезание происходит по границам генов тРНК за счёт сворачивания их в третичную структуру в процессе транскрипции. Вырезание пре-тРНК из незрелой митохондриальной РНК производится РНКазами семейств Р и Z с 5'- и 3'-концов соответственно [115], и этот момент, вероятно, служит сигналом к последующему полиаденилированию З'-конца белок-кодирующей мРНК, завершающему укороченный стоп-кодон до полного (ТАА).

Несмотря на простоту взаимодействия перекрывающихся генов тРНК и белков, нередки и случаи взаимного перекрытия генов тРНК между собой, что может представлять потенциальную проблему для теории тРНК-пунктуации. Тем не менее, в живых организмах наблюдаются полностью функциональные молекулы тРНК, которые зачастую отличаются последовательностью от своих генов [198]. Исследования процессинга человеческих тРНК in vitro показали, что при разрезании незрелого транскрипта только нижестоящая тРНК остаётся полной с 5'-конца, тогда как вышестоящая вырезается укороченной с 3'-конца [156], и, таким образом, лишена нуклеотида-дискриминатора, необходимого для дальнейшего формирования ССА-хвоста. Впоследствии на укороченную тРНК с системой тРНКаз, действует система репарации, которая, конкурируя достраивает З'-конец. Соответствие последовательности З'-конца репарированной тРНК её последовательности в геноме может быть неполным и зависит от количества отсутствующих нуклеотидов. Так при *in vitro* репарации человеческих тРНК белковым экстрактом клеток линии HeLa было показано, что для тРНК, укороченной на один нуклеотид, вероятнее всего, достройка дискриминатора на основе цитозина в той позиции, в которой генетическая последовательность кодирует аденин. Примечательно, что in vivo частота включений неверных нуклеотидов значительно ниже. Вероятнее всего, причиной тому конкурирующие системы деградации и репарации, а также быстрое образование аминоацил-тРНК
при формировании биологически активного 3'-конца [157]. В то же время для бактерий было показано, что замена в тРНК нуклеотида-дискриминатора с пуринового на пиримидиновый снижает энергию, необходимую для разрыва водородных связей в предыдущей позиции (спаренных нуклеотидов 5'- и 3'-концов), что приводит к частичному аминоацетилированию глутамином, вместо тирозина [113]. Таким образом, присоединение неверного нуклеотида-дискриминатора может снизить специфичность реакции аминоацетилирования тРНК, что обуславливает необходимость точной системы репарации.

Явление тРНК-пунктуации хорошо задокументировано и описано для множества таксонов, однако существуют также и обстоятельства, указывающие на возможную её неполноту. При анализе митохондриальных геномов можно обнаружить аномальные участки, сходные по структуре с генами тРНК, находящиеся внутри рамок считывания белковых генов и иногда имеющие антикодоны, соответствующие нормальным стоп-кодонам [137]. В ходе транскрипции такие последовательности могут формировать на незрелой РНК тРНК-подобные структуры, которые потенциально могут быть подвергнуты вырезанию РНКазами Р и Z, нарушая, таким образом, целостность мРНК, кодирующей белок. Тонкости механизма узнавания РНКазами своих таргетных сайтов не ясны. Вероятным объяснением точности их работы могло бы стать аминоацил-тРНК-синтетаз, специфических участие В процессе узнающих предшественников соответствующих им тРНК и направляющих работу РНКаз. Однако было показано, что у Arabidopsis thaliana РНКаза Р способна вырезать не только активные тРНК, но И подобные ИМ структуры ИЗ незрелых митохондриальных транскриптов *in vitro*, где исключено влияние посторонних ферментов [68]. На данный момент нет сведений о подобной активности РНКаз в отношении тРНК-подобных структур животных, однако данный вопрос требует дополнительного изучения, так как потенциально представляет проблему для аннотации митохондриальных геномов.

1.2.3 Использование митохондриальных геномов в эволюционной биологии

38

Для исследования различных вопросов молекулярной филогении используются маркерные фрагменты биополимеров, таких как белки И нуклеиновые кислоты. Вследствие вырожденности генетического кода, приводящей к частичной потере информации при переводе из триплетного нуклеотидного кода в аминокислотный пептидный, нуклеотидные маркеры получили гораздо большее распространение. Идеальный маркерный фрагмент должен соответствовать ряду критериев. Маркерный фрагмент должен иметь ортологичное происхождение в исследуемых организмах. По возможности, он должен наследоваться гаплоидно, чтобы исключить возможность рекомбинации. Маркерный фрагмент должен быть достаточно консервативен, чтобы его можно было легко выровнять и чтобы эффект насыщения заменами [149] на нём был незначителен. В то же время, он должен быть достаточно вариабелен, чтобы обеспечить разрешение на исследуемых таксономических уровнях. Маркер должен быть подвержен нейтральной эволюции [98, 100] и соответствовать гипотезе молекулярных часов – число накопленных замен должно линейно зависеть от времени с момента дивергенции [91]. Наконец, для маркерного участка должны существовать ПЦР-праймеры, достаточно специфичные, чтобы исключить коамплификацию нецелевого фрагмента (контамината, паралога и т.д.).

Отдельные митохондриальные гены (cox1, 12S, 16S, cytB, nad1) животных получили широкое распространение как маркеры для целей эволюционной биологии и популяционной генетики. Ввиду характера их наследования, в научном сообществе сложилось представление о митохондриальных генах как об маркерных участках. Считается, что идеальных за счёт вовлечённости митохондриальных генов в критически важные процессы клеточного дыхания, эволюция митохондриальной ДНК выглядит так, как если бы она была нейтральной и практически соответствует модели молекулярных часов: в случае вредоносных мутаций линии быстро погибают, а полезные мутации мгновенно распространяются в генофонде популяции, снова сменяясь нейтральными мутациями [61]. Наследуются митохондриальные геномы единой гаплоидной

копией по материнской линии, и практически не подвержены рекомбинации [158], следовательно, для диплоидных организмов эффективный размер популяции (числа особей, участвующих в размножении, при котором эффектами инбридинга и дрейфа генов можно пренебречь) в четыре раза ниже для митохондриальных генов, чем для ядерных. В связи с этим был сделан вывод, что филогенетические деревья, построенные на основе анализа митохондриальных генов, будут наиболее близки к отражению реальной эволюционной истории вида, чем деревья, основанные на ядерных генах [135].

В связи с широким использованием митохондриальной ДНК в качестве маркера филогенетической истории, стали разгораться споры о множестве допущений, которые делаются касательно характера её наследования и эволюции. Первым таким допущением является то, что митохондриальный геном наследуется только по материнской линии. Действительно, существует множество механизмов, которые элиминируют отцовскую копию митохондриальной ДНК до, при или после оплодотворения [191, 195]. Такое преставление о характере наследования митохондриальной ДНК не вызывало вопросов вплоть до 90-х годов ХХ века, когда в 1990 году было обнаружено, что гибриды двух видов дрозофил могут наследовать небольшое количество отцовских митохондрий [101] и что самцы съедобных мидий также имеют гетероплазмию по митохондриальному геному [59]. Впоследствии такое же явление было подтверждено на мышах [71], рыбах [124], синицах [105], овцах [200], курах [13] и людях [122]. Явление получило название "отцовская утечка" (paternal leakage). Тем не менее, даже при наличии гетероплазмии в организме существует дополнительный механизм, снижающий вероятность передачи отцовской ДНК внукам. Несмотря на довольно большое количество митохондрий в соматических клетках и ооцитах, первичные половые клетки (гоноциты) содержат менее 10 митохондрий, что снижает шанс передачи гетерогенного набора митогеномов потомству. Этот механизм получил название "гоноцитарное бутылочное горлышко" (germ line bottleneck) [87]. Таким образом, в царстве животных наследование отцовской митохондриальной ДНК является не качественным, а количественным вопросом.

Вторым допущением, оправдывающим использование митохондриальной ДНК при филогенетических исследованиях, является отсутствие рекомбинации. До конца XX века считалось, что митохондриальная ДНК не подвержена наиболее рекомбинации И поэтому точно отражает эволюцию одной генеалогической линии. Однако в 1999 году два исследования обнаружили необычно высокий уровень гомоплазии у людей, который мог быть объяснён только рекомбинацией [18, 54]. Несмотря на то, что позже результаты этих исследований были объяснены методологическими ошибками, за ними последовала череда открытий рекомбинации на популяционном уровне [например, 61]. Действительно, наличие в митохондриях нескольких копий генома должно способствовать рекомбинации даже между геномами одного происхождения. Особенно заметна такая рекомбинация в насыщенном повторяющимися мотивами контрольном регионе, поскольку она приводит к формированию вариабельности в длине контрольного региона [80]. Существование рекомбинации В ДНК митохондриальной сложно поскольку не доказать, она всегда сопровождается формированием новых гаплотипов. В сочетании с редкостью самого события и несовершенством методов это может привести к тому, что большинство исследований, направленных на поиск рекомбинации, могут просто пропускать её [158]. С другой стороны, в некоторых случаях гомоплазия в митохондриальной ДНК может быть вызвана не рекомбинацией, а "горячими точками" мутаций [61].

Третье допущение состоит в том, что митохондриальный геном эволюционирует нейтрально и согласуется с гипотезой молекулярных часов, подвергаясь, в основном, нейтральным и вредоносным мутациям. Первые легко детектируются, и их наличие используется в филогенетических и популяционногенетических исследованиях, а вторые быстро уничтожаются стабилизирующим отбором. Однако как было показано в крупном метаанализе 1683 видов, генетическое разнообразие митохондриальной ДНК не зависит от размера популяции, что идёт вразрез с предположением о её нейтральной эволюции [20]. Такой результат может быть связан с мгновенным распространением гаплотипа с положительными мутациями в популяциях и заменой им менее адаптированных гаплотипов (selective sweep). В ядерных геномах, где рекомбинация более выражена, появление таких полезных мутации приводит К снижению вариабельности нуклеотидов вблизи неё по принципу сцепленности. набором Митохондриальные геномы наследуются гомогенным копий материнского митогенома, и их рекомбинация происходит реже, поэтому действие движущего отбора чаще выражается в полной смене гаплотипа в популяции. Тем не менее, несмотря на то, что такие события могут искажать результаты филогенетических исследований, они могут оказаться полезны для ДНКштрихкодирования, снижая уровень внутривидовой вариабельности [61]. Другим примером нарушения нейтральности эволюции митохондриального генома является распространение "эгоистичной" вредоносной мутации у Saccharomyces cerevisiae, приводящей к дыхательной недостаточности, но при этом имеющей более высокую скорость репликации по сравнению с диким типом [123]. Наконец, нейтральность эволюции может быть нарушена через действие "генетического автостопа" (genetic hitchhiking). Известно, ЧТО облигатные паразиты членистоногих рода Wolbachia могут влиять на частоты мужских и женских фенотипов в популяции, разными способами удаляя из неё самцов [166]. Исследование филогении на основе гена цитохрома В с использованием палеонтологических калибровочных точек указывает на то, что скорость эволюции разных групп организмов может варьировать от 30 раз у птиц и до 100 раз у млекопитающих [140], положительно коррелируя с размерами популяции и отрицательно – с продолжительностью жизни организма. С этим согласуется вывод, что делимитация таксонов на основе гена цитохрома В чрезмерно дробит таксоны крупных животных и чрезмерно объединяет таксоны мелких [35].

Таким образом, результаты, полученные с использованием различных митохондриальных маркеров, должны быть использованы с осторожностью и по калиброваны с использованием возможности ядерных генов или палеонтологических свидетельств. Митохондриальные маркеры со всеми их преимуществами недостатками остаются крайне популярными И ДЛЯ

молекулярных работ по систематики и филогении, и не стоит отказываться от них ввиду не полного соответствия идеализированным критериям [162].

1.3 Современные методы эволюционных исследований

1.3.1 Методы секвенирования нового поколения

поколения (NGS) – это Секвенирование нового группа методов, позволяющих в параллельном режиме независимо прочитывать множество разнородных молекул нуклеиновых кислот. Предпосылкой к созданию методов секвенирования нового поколения стало использование более старой технологии молекулярного клонирования, основанной на явлении бактериальной трансформации [69] и используемой для *de novo* секвенирования. Таким методом была выполнена большая часть работ в проекте "Геном человека" [12]. Несмотря на то, что в современных методах массового параллельного секвенирования прочтению подвергается множество фрагментов за один раз и в них не используются живые организмы для наработки модифицированной ДНК, принцип случайного дробления генетического материала изучаемого организма с присоединением к полученным фрагментам адаптеров известной структуры для последующей амплификации сохранился до сегодняшнего дня.

Первым методом второго поколения стало разработанное в 1996 году пиросеквенирование [159]. Технология была коммерциализирована в 2005 году. С развитием других технологий платформа стала неконкурентоспособной, и в 2013 году компания Roche, ранее выкупившая компанию 454 Life Sciences, объявила о прекращении её поддержки [82]. Достоинством платформы являлась довольно большая для платформ второго поколения длина прочтений – до 700 оснований. К недостаткам можно отнести дороговизну реактивов, наличие сложного этапа эмульсионной ПЦР, неспособность точно определять длину гомополимеров и не самую большую производительность [97].

Наиболее популярным методом секвенирования второго поколения на сегодня является секвенирование путём синтеза с обратимым терминированием, разработанное в 1994 году [32] и коммерциализированное в 2006 году компанией

Solexa, приобретённой компанией Illumina. впоследствии Суть метода заключается в случайном высевании амплифицированных фрагментов геномной ДНК с универсальными праймерами-адаптерами на кремниевую подложку, на иммобилизованы которой олигонуклеотиды, комплементарные праймерам-Затем на этой подложке происходит адаптерам. процесс твердотельной полимеразной цепной реакции, результатом которой становится формирование микроскопических кластеров – скоплений клонов каждого отдельного фрагмента ДНК, различимых в микроскоп. Затем к полученным ампликонам добавляется праймер, после чего начинается секвенирование, в ходе которого на подложку подаётся смесь нуклеотидов с флуоресцентными метками. ДНК-полимераза встраивает по одному нуклеотиду за раз, поскольку флуоресцентные метки блокируют их 3'-гидроксильные группы. Камера фиксирует светимость каждого кластера, определяя таким образом терминальный нуклеотид в данном цикле. После этого флуоресцентная метка удаляется, и цикл повторяется. По прошествии 150-300 циклов (в зависимости от версии платформы) комплементарный ампликон удаляется, и чтение может быть продолжено с противоположной стороны с использованием обратного праймера. Преимуществом данного метода можно назвать его высокую производительность и лучшее соотношение цены к объёму получаемых данных. К недостаткам метода можно отнести небольшую максимальную длину прочтения, а также высокую чувствительность прибора к вибрации [85].

Параллельно с секвенированием путём синтеза развивался принципиально отличный метод секвенирования путём лигирования, реализованный в 2006 году в платформе SOLiD. Процесс заключается в циклическом лигировании меченных флуоресцентными красителями 8-нуклеотидных зондов, первые два нуклеотида которых комплементарны исследуемой ДНК, регистрации флуоресценции и отрезании трех конечных нуклеотидов. Затем полученную комплементарную цепь денатурируют и вымывают и повторяют процедуру с использованием праймеров, сдвинутых на n-1 – n-4 нуклеотида. Преимуществом данной технологии является её крайне высокая точность (каждый нуклеотид проверяется два раза, и цвета

флуоресцентных меток зондов зависят от двух нуклеотидов) и производительность при низкой стоимости на нуклеотид. Недостатком метода является длительность проведения пяти раундов секвенирования, а также систематические ошибки при прочтении палиндромных последовательностей [84].

Метод полупроводникового секвенирования, реализованный в платформе Ion Torrent [163]. более совершенным стал наследником метода пиросеквенирования. В нём присутствуют те же этапы пробоподготовки, однако секвенирование проводится на подложке с полупроводниковыми сенсорами, и детекция присоединяемого нуклеотида происходит путём измерения рН в колодце с частицей твёрдого носителя. При включении нуклеотида происходит выделение в раствор иона водорода, сдвигающего рН в кислую сторону. Величина такого сдвига пропорциональна количеству одновременно включённых нуклеотидов. От метода пиросеквенирования к этому методу перешла способность генерировать довольно длинные по меркам методов второго поколения прочтения (до 400 оснований), а за счёт упрощённой химии платформа Ion Torrent остаётся конкурентоспособной Как И на сегодняшний день. И y метода пиросеквенирования, V полупроводникового метода есть недостаток С неспособностью точно определять длину гомополимеров, так как точность определения силы ионного тока, равно как и точность определения яркости свечения падает с увеличением длины гомополимера [97].

Несмотря на свою полезность, методы секвенирования второго поколения имеют ряд недостатков. Главным недостатком является обязательный этап ПЦРамплификации геномных библиотек при создании или формировании микроскопических кластеров. На этом этапе велика вероятность внесения ошибок данные, особенно при наличии в геноме длинных гомополимерных, В повторяющихся и палиндромных участков. Кроме этого недостатком методов второго поколения является небольшая длина прочтений (не более 700 оснований). Для решения этих проблем в последнее время начинают применяться методы третьего поколения.

Первым методом третьего поколения стало одномолекулярное секвенирование в реальном времени (Single Molecule Real Time; SMRT), разработанное компанией Pacific Biosciences [48]. Данная технология позволяет в параллельном режиме проводить секвенирование единичных ДНК-молекул, минуя этап амплификации за счёт использования волноводов нулевой моды (zero mode waveguide), детектировать световой позволяющих сигнал OT включения полимеразой единичного нуклеотида в единичную молекулу ДНК [114]. Скорость продолжительность работы секвенатора на этой основе теоретически И ограничивается только скоростью и стабильностью молекулы ДНК-полимеразы, поэтому данный метод позволяет генерировать прочтения большой длины (до 64 500 оснований [141]). Несмотря на довольно значительный процент ошибок, генерируемых по такому методу, особый метод построения библиотеки, состоящий в замыкании исследуемой ДНК в кольцевую молекулу, позволяет многократно обследовать один и тот же участок, нивелируя таким образом эффект случайных ошибок. Недостатком данной технологии можно назвать довольно высокую стоимость секвенирования по отношению к объёму выходных данных, ввиду сравнительно небольшого числа одновременно секвенируемых молекул [97].

Самой молодой на сегодняшний день технологией секвенирования третьего поколения является нанопоровое секвенирование, коммерциализированное в 2014 году компанией Oxford Nanopore Technologies [189]. Метод заключается в измерении ионного тока, проходящего через нанопору из бактериального альфагемолизина (αHL) в процессе протяжки через неё одноцепочечной ДНК с помощью моторного белка. При прохождении различных нуклеотидов через нанопору ионный ток изменяется на разную величину. Сформировав библиотеки таким образом, чтобы на одном конце исследуемый фрагмент имел замкнутую структуру (шпильку), можно добиться прочтения обеих цепей ДНК в один проход, снижая таким образом эффект случайных ошибок. Каждая нанопора может последовательно пропускать через себя несколько молекул ДНК, пока белок не деградирует, либо пока не будет истощён доступный пул молекул. Учитывая, что в каждый момент времени в нанопоре находится короткий фрагмент ДНК, сигналы нуклеотидов (basecalls), полученные по этой технологии наиболее сложны для расшифровки, что приводит к довольно высокой доле погрешности. К преимуществам данной технологии относится компактность приборов (некоторые модели помещаются на ладони), что позволяет использовать их даже в полевых условиях в отсутствие сложной инфраструктуры, а также дешевизна приборов, реактивов и прочтений при самой большой на сегодняшний день длине прочтений – свыше двух миллионов оснований [121].

1.3.2 Обзор методов молекулярной эволюции и филогении

Все формы жизни на земле, включая вымерших, происходят от общего предка, и их эволюционная история – это порядок их дивергенции на протяжении истории. Чем позже две формы жизни дивергировали от общего предка, тем они более родственны между собой [196].

Наиболее простым дистантным методом построения деревьев является метод невзвешенного попарного группирования по средним арифметическим (UPGMA) [177]. Алгоритм базируется на использовании последовательного группирования по матрице попарных дистанций, при котором древо строится в несколько этапов, на каждом из которых группируются наименее удалённые друг Метод UPGMA OT друга последовательности. всегда подразумевает ультраметрическое древо, в котором сумма длин ветвей от всех листьев до корня одинакова. Это наиболее простой метод, основанный на гипотезе строгих молекулярных часов. На сегодняшний день этот метод практически не применяется, поскольку в расчётах он не ориентируется на различные модели ЭВОЛЮЦИИ.

Метод присоединения соседей (NJ) является модификацией метода UPGMA, призванной скорректировать его ошибку, связанную с различными скоростями эволюции в соседних группах [165]. Принципиальное отличие этого метода от UPGMA состоит в том, что в последнем в кластер объединяются две последовательности, имеющие наименьшую дистанцию между собой, независимо от остальных дистанций. В данном же методе кластеризуются последовательности, дающие наименьшую сумму длин ветвей. При этом длины ветвей, исходящих от одного узла могут быть не равны, то есть полученное древо не является ультраметрическим.

В отличие от дистантных методов, базирующихся на анализе степени генетической дивергенции, конвертированной в числовые дистанции, методы анализа дискретных признаков рассматривают различия последовательностей в конкретных позициях [138]. Их целью является реконструкция сценария, наиболее вероятно объясняющего порядок конкретных нуклеотидных замен в эволюционной истории.

Метод [60] максимальной экономии (MP) направлен на поиск филогенетического древа, требующего наименьшего числа нуклеотидных и аминокислотных замен для объяснения наблюдаемых различий. В основе этого анализ нуклеотидов или аминокислот в так называемых метода лежит парсимонийно-информативных позициях (parsimonious sites), позволяющих отдать предпочтение конкретному сценарию эволюции. Для анализируемой группы последовательностей может существовать несколько вариантов деревьев, равновероятно объясняющих наблюдаемые различия. Во время этого анализа генерируется максимальное число филогенетических деревьев, объясняющих замены во всех различных позициях генома, однако в дальнейшем замены, делающие различные сценарии эволюции равновероятными, не учитываются. Соответственно, с увеличением числа И длины анализируемых последовательностей сложность этого анализа возрастает, но вместе с этим возрастает его разрешение и достоверность.

В отличие от MP-метода, метод максимального правдоподобия (ML) [56, 57] базируется на использовании моделей эволюции (Таблица 2) для построения филогенетического древа, исходя из оценки вероятности (правдоподобия) нахождения каждого конкретного нуклеотида в каждой конкретной позиции согласно данной модели. Разница между понятиями "вероятность" и "правдоподобие" в том, что функция вероятности позволяет предсказать

предполагаемые исходы при известных изначальных параметрах, тогда как функция правдоподобия, напротив, позволяет оценить изначальные условия, исходя из известных результатов. В данном случае известными результатами являются нуклеотидные последовательности, из которых можно оценить частоты встречаемости нуклеотидов и предполагаемые скорости замен, согласно модели. Неизвестным же изначальным параметром является топология и длины ветвей филогенетического древа, объединяющего последовательности. При этом методе строится максимально возможное количество деревьев для всех сценариев эволюции. объясняющих имеющиеся замены В последовательностях. Предпочтение отдаётся тому древу, которое максимально соответствует частотам нуклеотидов и функции накопления замен во времени согласно какой-либо модели.

Модель	Различные частоты нуклеотидов	Различия в скорости накопления ts* и tv**	Различия в скоростях ts*	Различия в скоростях tv**
JC69	-	-	-	-
K80	-	+	-	-
F81	+	-	-	-
HKY85	+	+	-	-
TN93	+	+	+	-
GTR	+	+	+	+

Таблица 2 – Краткая характеристика моделей молекулярной эволюции

* ts – транзиция, ** tv – трансверсия.

Все вышеперечисленные подходы могут использовать в своей процедуре дополнительный этап, позволяющий извлечь больше информации из тех же самых изначальных данных. Это методы многократной выборки, известные как метод складного ножа ("jackknife") и его более часто используемый аналог – бутстрепметод ("bootstrap"). Суть методов заключается в многократной реконструкции

филогенетических наборов деревьев на основе частичных данных С использованием ранее определённых моделей эволюции. При использовании метода складного ножа из нуклеотидного или аминокислотного выравнивания генерируются n наборов данных длиной n-1, где n – длина выравнивания. Метод бутстреп лучше подходит для более длинных последовательностей, поскольку при его использовании генерируется установленное число наборов данных, равных по длине изначальному, но с условием, что одна и та же позиция может быть отобрана многократно. Необходимое число бутстреп-повторов зависит от конкретного набора данных, чаще всего выводя топологию древа в стационарное состояние после 100-500 повторов [147], однако, как правило, используется 1000 повторов, установленные в филогенетических программах в качестве значения по умолчанию. Филогенетические деревья, полученные на основе таких частичных наборов данных, затем сравниваются и объединяются в консенсусное древо, в котором узлы имеют числовые значения поддержек, равные доле деревьев, имеющих в своей топологии данный узел. Таким образом, показатели поддержек от данных методов демонстрируют, насколько топология консенсусного древа поддерживается исходными данными.

Байесовский подход в филогенетических исследованиях (BI) позволяет получить наиболее правдоподобное филогенетическое дерево при заданных исходных данных – последовательностях ДНК или белков рассматриваемых организмов и эволюционной модели замен. Для снижения вычислительной сложности алгоритма расчёт апостериорной вероятности реализуется различными алгоритмами, использующими метод Монте-Карло для марковских цепей [109]. Главными преимуществами байесовского подхода по сравнению с методами правдоподобия максимальной максимального И экономии являются вычислительная эффективность, способность работать со сложными моделями эволюции, а также то, что, в отличие от методов, указывающих на единственное наилучшее по заданному критерию дерево, он позволяет выбрать несколько вариантов филогенетического дерева с наибольшим значением апостериорной вероятности [81].

байесовского статистического Применение реконструкции метода К филогении позволило расширить метод максимального правдоподобия И адаптировать его для более сложных моделей. В то время как метод максимального правдоподобия нацелен на оценку вероятности данных для древа, байесовский метод оценивает апостериорную вероятность древа для данных, учитывая априорную вероятность древа и его правдоподобие, рассчитанное согласно модели [136]. Используя апостериорную вероятность предыдущего древа в качестве априорной вероятности для следующего, алгоритм повторяется многократно с использованием методов Монте-Карло для марковских цепей до тех пор, пока модель не выйдет в стационарное состояние, и дальнейшие итерации уже не будут приводить к значительным изменениям апостериорной вероятности. В реконструкции консенсусного древа учитывается множество деревьев с наивысшими оценками апостериорных вероятностей, полученных после выхода модели в стационарное состояние, и таким образом, консенсусное древо основано не на точечной оценке, а на плотности вероятности в стационарном состоянии.

Ещё одним преимуществом байесвоского метода по сравнению с методом максимального правдоподобия является большее количество возможных свободных параметров для оценки. В ходе анализа по методу максимального правдоподобия оценке подвергаются такие параметры, как топология древа и длины ветвей, однако параметры самой модели остаются неизменными. В ходе байесовского анализа такие параметры модели, как частоты встречаемости нуклеотидов и скорости замен могут оцениваться непрерывно, и их значения используются для оценки апостериорной вероятности древа в каждой итерации. При всех своих достоинствах байесовский подход не является слишком требовательным к вычислительным ресурсам ввиду применения в нём метода Монте-Карло для марковских цепей.

Байесовский подход, хоть и считается на сегодняшний день самым совершенным и достоверным, тем не менее, не лишён недостатков. Было показано, что значения бутстреп-анализа, вычисленные методами максимальной экономии или правдоподобия, обычно ниже, чем апостериорные вероятности,

полученные байесовскийим методом [63]. Это приводит к ряду вопросов. Например, приводят ли апостериорные вероятности к завышению вероятности результата? Являются ли значения бутстреп-поддержек более устойчивыми по сравнению с апостериорными вероятностями?

Многие исследователи поднимали вопрос об интерпретации байесовскийого вывода, когда модель неизвестна или неверна. Например, слишком упрощенная модель может дать более высокие апостериорные вероятности [51, 179] или может быть связана с большей неопределённостью по сравнению с той, которая вытекает из бутстреп-анализа.

Эволюционные модели, заложенные в основе методов ML и BI, призваны ввести поправку на различие между наблюдаемыми генетическими и реальными эволюционными дистанциями. С течением времени с момента расхождения от общего предка растёт количество мутаций в ортологичных последовательностях. Однако ввиду ограничения по числу дискретных состояний для каждой позиции биополимеров (четыре состояния для нуклеотидных и 20 состояний для аминокислотных последовательностей), количество наблюдаемых состояний зависит от фактического количества замен нелинейно. В одних и тех же позициях в последовательностях биополимеров замены могут происходить многократно, в том числе и на мономеры, характерные для предковых форм. График зависимости числа наблюдаемых замен от времени по форме является логарифмическим и всегда находится ниже графика ожидаемых дистанций при данной скорости накопления замен. Для введения поправки на этот факт было разработано множество моделей молекулярной эволюции с различными уровнями сложности. Наиболее популярные в филогенетических работах модели замен и их различия представлены в таблице 2, тогда как сравнение методов филогенетического анализа приведено в таблице 3.

Метод	Достоинства	Недостатки
UPGMA	Простота и высокая скорость	Не основывается на различных
	вычисления.	моделях эволюции. Информация
		теряется при преобразовании замен в
		попарные дистанции. Косвенно
		основан на гипотезе строгих
		молекулярных часов, не
		учитывающих различную скорость
		эволюции в разных таксономических
		группах.
Neighbor-	Простота и высокая скорость	Не основывается на различных
Joining	вычисления. Делает поправку на	моделях эволюции. Информация
	различные скорости эволюции в	теряется при преобразовании замен в
	разных таксономических группах.	попарные дистанции.
Maximum	Достаточно быстр для анализа	Плохо работает при больших длинах
Parsimony	сотен последовательностей. Даёт	ветвей и при широкой
	хорошее разрешение при	вариабельности их длин.
	небольших длинах ветвей.	
Maximum	Полностью основан на	Относительно медлителен и
Likelihood	современных моделях эволюции.	требователен к вычислительным
	Анализирует генетические	мощностям, в зависимости от
	последовательности полностью,	требований к разрешению.
	включая инвариантные сайты.	
Bayesian	Полностью основан на	Должны быть указаны априорные
Inference	современных моделях эволюции с	распределения параметров
	большим числом свободных	вероятности.
	параметров, компенсируя их	Неоднозначен вопрос достоверности
	сложность более быстрыми	апостериорных вероятностей по
	алгоритмами вычисления.	сравнению с бутстреп-поддержками.
	Анализирует не одно древо с	Чувствителен к выбору модели
	самыми высокими значениями, а	эволюции.
	множество.	

Таблица 3 – Сравнение филогенетических методов

Для введения поправки на небольшие вариации в скорости накопления замен в разных линиях и неравное соотношение транзиций и трансверсий на разных генетических дистанциях [196] было предложено относиться к скоростям замен в каждой позиции как к случайной переменной, полученной из определённого распределения. Наиболее подходящим к биологическим данным является гамма-распределение [188], однако с целью облегчения вычислений непрерывное гамма-распределение разбивается на дискретное количество категорий, дистанции в которых представляются средним или медианным значением. Число гамма-категорий в большинстве исследований варьирует от 2 до 32, однако использование более 8-10 категорий не приводит к значительному увеличению согласования модели и данных [88].

Часть позиций в нуклеотидных последовательностях напрямую влияет на способность продукта гена оказывать влияние на фенотип организма. Ввиду того, что маркерами в филогенетических исследованиях зачастую являются жизненноважные гены «домашнего хозяйства» (например, гены больших и малых субъединиц рибосомальной РНК, гены компонентов дыхательной цепи), мутации в регионах, кодирующих активные центры продуктов этих генов, находятся под действием жёсткого стабилизирующего отбора и являются неизменными в широком диапазоне таксонов. Такие позиции называются инвариантными и должны быть учтены в модели нуклеотидных замен. Удаление инвариантных позиций или оценка их как вариабельных может привести к искажению длин ветвей и топологии деревьев [112, 116].

1.3.3 Сегментация данных

С увеличением объёма данных, таких как длина последовательностей биополимеров, достоверность филогенетического анализа, как правило, возрастает. Однако вместе с тем возрастает и ошибка, связанная с представлением гомогенности используемых Существует множество 0 данных. работ. указывающих на наличие вариабельности в скорости эволюции в различных сайтах маркерных генов ("among-site rate variation") [178]. Например, исходя из триплетности и вырожденности генетического кода, считается, что скорости замен в третьих позициях кодонов должны быть выше, чем в первой и второй, поскольку третья позиция оказывает минимальное влияние на кодируемую аминокислоту. Таким образом, с течением времени характер накопления замен в третьих позициях кодонов белок-кодирующих генов будет стремиться к нейтральному,

тогда как первая и вторая позиции кодона будут находиться под действием стабилизирующего отбора. Это приводит к тому, что для древних событий дивергенции будет заметен эффект насыщения заменами – явления, при котором нуклеотиды в третьей позиции были заменены многократно, включая возвратные замены, – которое искажает результаты филогенетического анализа с упрощённой 194]. Гены рибосомальных РНК, моделью [28,часто используемые В эволюционных исследованиях, не являются триплетными, однако скорости эволюции между их функциональными доменами и линкерными участками также могут варьировать. Кроме того, некодирующие гены в большей степени подвержены накоплению инсерций и делеций, которые значительно усложняют процесс выравнивания нуклеотидных последовательностей и могут повлиять на результаты филогенетической реконструкции.

Для сглаживания искажений, получаемых в связи с различными скоростями эволюции в различных сайтах, были предложены разные подходы. Наиболее простым из них является удаление из набора данных плохо выравненных позиций, либо насыщенных третьих позиций. Однако третьи позиции кодонов зачастую содержат значительный филогенетический сигнал [117], качество которого может превосходить качество совмещённого сигнала от первых и вторых позиции [174]. Удаление плохо выравненных участков из файлов с нуклеотидными и белковыми последовательностями также не приводит к значительным улучшениям по сравнению с реконструкциями на основе нефильтрованных данных [43, 182].

Вторым распространённым методом решения проблемы влияния вариаций в скорости эволюции является сегментация данных ("partitioning") [90]. Суть метода состоит в разделении набора данных на сегменты, для каждого из которых затем рассчитывается оптимальная модель замен, впоследствии используемая при реконструкции филогении. Данные, включающие в себя участки нескольких генов, могут быть разделены по границам этих генов. В свою очередь, сегменты, соответствующие генам, могут быть разделены на функциональные домены и линкеры, а также по позициям нуклеотидов в кодонах. В экстремальном теоретическом сценарии модель можно обозначить для каждого нуклеотида или

аминокислоты, что является чрезмерной параметризацией. Для определения оптимального количества сегментов и соответствующих им моделей замен были разработаны различные программные пакеты. Наиболее популярным из них PatritionFinder2 [107]. Принимая является программа на ВХОД файл c выравненными нуклеотидными или белковыми последовательностями или трансформированными в числовые значения морфологическими данными, а также опционально схему сегментации, обозначенную пользователем на основе биологических данных, она объединяет сегменты, соответствующие одинаковым моделям замен. Для сгруппированных таким образом сегментов рассчитывается модель замен, которая затем может быть использована в программах для реконструкции филогении.

небольшое PartitionFinder2 Недостатком является число свободных параметров, которые делают результаты его расчётов достаточными для реконструкции филогении по методу ML, но недостаточными для расчёта по методу ВІ [106]. Для преодоления этого ограничения было разработано дополнение к программе BEAST2, названное substBMA. Пакет substBMA позволяет одновременно оценивать оптимальное количество сегментов в наборе нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, распределять отдельные сайты по полученным сегментам, рассчитывать для каждого из них модель нуклеотидных замен, а также одновременно реконструировать филогению для этого набора данных [193]. Данный подход позволяет исключить ошибку, связанную с априорной сегментацией данных пользователем, что делает данный анализ более объективным и воспроизводимым. Однако неспособность данного пакета использовать ресурсы графических ускорителей сильно замедляет его работу и делает неоправданным его использование для длинных геномных В последовательностей. связи с ЭТИМ получил метод не широкого распространения. На сегодняшний день сегментация при помощи программы PartitionFinder2 остаётся наиболее популярным подходом.

1.3.4 Методы молекулярной делимитации таксонов

Одной из ключевых задач современной таксономии является создание системы чистых таксонов, объединяющих организмы по признаку их родства. Ввиду относительно малого количества внешних признаков, морфофизиологический подход в систематике плохо различает синапоморфию – группой общего признаки, унаследованные ОТ предка И потому свидетельствующие о родстве, и гомоплазию – признаки, приобретённые в нескольких эволюционных линиях независимо. В случаях конвергентной эволюции анализ морфологии не способен дать высокого разрешения [153]. Некий признак, возникший в результате конвергентной эволюции, при таком анализе будет расценен как объединяющий эти формы жизни.

Принципиальным отличием кладистического подхода является базирование таксономической системы не на сходствах форм жизни, а на их общем эволюционном происхождении. При этом базовым принципом является выделение в таксоны монофилетических групп, поскольку только в отношении них можно формулировать содержательные обобщения [154]. В соответствии с группировкой нуклеотидных последовательностей на древе и дистанциями между ними эти объединяются последовательности В кластеры (клады). которые часто конфликтуют с таксонами традиционной систематики. В идеале систематика форм жизни должна быть направлена на выявление и отнесение к различным таксонам лишь монофилетических групп. Однако сам по себе филогенетический анализ не данных о границах клад. При анализе группировки даёт однозначных последовательностей на филогенетическом древе ИХ принадлежность К определённой кладе должна подкрепляться морфологическими данными. Таким образом, молекулярная филогения является не заменой морфологической систематике, а равноправным инструментом для таксономистов.

За время использования молекулярных данных в таксономических исследованиях было предпринято множество попыток создать объективные и стандартизированные методы делимитации (разграничения) таксонов на основе этих данных. Однако в филогенетических работах использовалось множество

генетических маркеров из различных участков генома, что приводило к сложностям интерпретации результатов, сравнения их с другими работами и выработке единого методологического подхода.

Наиболее успешная идея стандартизации разграничения таксонов была выдвинута в 2003 году. Методика, названная ДНК-штрихкодированием ("DNA barcoding"), основана на использовании митохондриального гена cox1 и призвана преодолеть ограничения как традиционной систематики, основанной на морфологии, так и простого кладистического анализа на древе с целью обнаружения скрытого биологического разнообразия [76]. Идея простого метода определения принадлежности образцов, в том числе частично сохранившихся, любой доступногого В точке планеты молекулярным биологам, не специализирующимся в систематике, быстро получила популярность и начала развиваться взрывными темпами [77]. На сегодняшний день в базе данных "Barcode Of Life Database" числится более 10 миллионов штрихкодов от 330 тысяч видов [19].

В ранние годы развития метода ДНК-штрихкодирования разграничивать виды предлагалось, используя произвольный порог в 3% нуклеотидных различий в последовательности *cox1* [76]. Однако такой подход быстро был признан несостоятельным из-за различий в скоростях эволюции разных таксонов. Наиболее популярным методом, призванным стандартизировать определение порогового значения внутривидовых генетических дистанций и снизить в нём элемент субъективной оценки, стал метод анализа филогенетических деревьев "Generalized Mixed Yule Coalescent" (GMYC) [151]. Метод основывается на статистической обработке ультраметрических филогенетических деревьев с молекулярными часами. Он обнаруживает статистически наиболее вероятный порог между внутри- и межвидовыми процессами, выражающийся как скачок в частоте событий ветвления на филогенетическом древе. Поскольку он не опирается на дополнительные доказательства для формирования оперативных таксономических единиц (OTE), этот метод может быть применён в случаях

нехватки дополнительных данных, которыми определяются границы вероятных видов.

Разделение видов с помощью GMYC базируется на привязке стадий ветвления к двум категориям: видообразование и коалесценция внутри видов. С допущением, что вид монофилетический, можно обозначить набор узлов от последнего общего предка для определения характера процессов ветвления. Метод позволяет выявить узлы, отражающие пороговые значения внутривидовых вариаций. Все процессы, находящиеся между этими узлами и корнем древа считаются коалесцентными процессами.

любому Модель GMYC быть В теории может применена К ультраметрическому древу, однако в основном применяется для анализа деревьев, построенных на основе маркерного фрагмента гена *cox1*. Влияние использования фрагментов результаты **GMYC**-анализа геномных на остаётся других неизученным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор, идентификация и фиксация образцов

Сбор образцов акантобделлид проведен в пресных водоёмах Северной Евразии (от Швеции до Камчатки) в период с 2002 по 2018 год путём снятия их с хозяев. Географические данные о местах сбора образцов представлены в таблице 4.

Вид	Точка сбора	Номер образца
	р. Питэльвен, Швеция	Б28
	р. Барбитай, Иркутская Область	Б33
	оз. Большой Харбей, Ненецкий АО	Б35
Acanthobdella peledina	оз. Лабынкыр, Республика Саха	Б52
	(Якутия)	
	р. Рассоха, Иркутская Область	Б53
	р. Яна, Республика Саха (Якутия)	Б55
Paracanthobdella livanowi	оз Ажабацье Камцатский Край	Б49
		Б56
Codonobdella sp	оз Байкац зацив Мацое Море	Б45
Couonobaena sp.	03. Dankall, saling manoe mope	Б47
Baicaloclepsis grubei	оз. Байкал, залив Малое Море	Б57
Baicaloclepsis echinulata	оз. Байкал, пролив Ольхонские Ворота	Б58

Таблица 4 – Места сбора и условные обозначения исследуемых образцов

Основной хозяин A. peledina – сибирский хариус (Thymallus arcticus), в меньшей степени – остромордый ленок (Brachymystax lenok), обыкновенный валёк (Prosopium cylindraceum) и арктический голец (Salvelinus alpinus). Хозяева P. livanowi – различные виды гольцов (Salvelinus). Образцы эндемичных байкальских рыбьих пиявок Codonobdella sp. были сняты с рыболовных сетей, однако они не были прикреплены к самим рыбам. Образцы эндемичных

байкальских плоских пиявок *Baicaloclepsis grubei* и *Baicaloclepsis echinulata* были собраны водолазами в оз. Байкал на глубине до 30 м. Видовую принадлежность пиявок определяли в соответствии с таксономическими ключами [4, 11]. Образцы были фиксированы 70% этанолом и помещены для хранения в морозильную камеру при температуре -20°C.

2.2 Выделение и секвенирование ДНК

Для предотвращения контаминации ДНК акантобделлид генетическим материалом хозяина были предприняты дополнительные меры. Образцы перед выделением ДНК были очищены от слизи при помощи ватных палочек и промыты свежим 70% этанолом. Затем образцы были вскрыты, и из них был удалён кишечник, после чего они были промыты повторно. Очищенные ткани были регидратированы путём помещения в дистиллированную воду на 10 минут. Процедура регидратации повторялась трижды, каждый раз со сменой воды, сопровождаемой пипетированием. Затем жидкость была отобрана, и образец был растёрт до гомогенного состояния с использованием пластикового пестика.

Выделение ДНК из гомогената большей части образцов проводили с использованием набора для выделения ДНК из культур клеток на основе ионообменных колонок (DiaGene). Для выделения ДНК из образцов, с сильно деградировавшим материалом был генетическим использован фенолхлороформный метод экстракции. К гомогенату было добавлено 400 мкл лизисного буфера, содержащего 0.1 М Tris-HCl 0,05 М СТАВ, 0,005% 2меркаптоэтанола, 0,2 М EDTA, 1,4 М NaCL, pH=8,0. Смесь была перемешана встряхиванием, после чего помещена на 1 час на термошейкер при температуре 65°С при 400 об./мин. После этого к лизату был добавлен равный объём смеси ТЕнасыщенного фенола: хлороформа:изоамилового спирта в пропорции 24:24:1. Образцы были поставлены на ротатор на 40 минут при 4 об./мин. Затем взвесь была центрифугирована 20 минут при 10 000 g RCF. Верхняя (водная) фаза была отобрана в чистые пробирки, после чего к ней был добавлен 1 мкл соосадителя Satellite Red (Евроген), 1/10 объёма 3М ацетата натрия и 3 объёма 96% этанола.

Раствор был перемешан и центрифугирован 10 мин при 10.000 g RCF. Осадок был промыт 80% этанолом, высушен и растворён в 50 мкл деионизированной воды.

Для отдельных образцов акантобделлид была проведена ПЦР-амплификация маркерных фрагментов генов *cox1* и *12S*. Секвенирование маркерных фрагментов по Сэнгеру проведено в НПК «Синтол» (Москва). Условия амплификации каждого гена представлены в таблице 5.

Фрагмент	Температура (°С)	Время	Количество циклов
	94	1 мин.	1
	94	20 сек.	
	40	1 мин. 30 сек.	5
coxl	72	2 мин.	-
	94	20 сек.	
	45	1 мин. 30 сек.	35
	72	2 мин.	
	94	40 сек.	1
128	94	30 сек.	
	45	1 мин. 20 сек.	25
	72	1 мин. 20 сек.	

Таблица 5 – Условия амплификации маркерных генов

Для проведения полногеномного секвенирования была выбрана технология Illumina, исходя из экономических соображений и низкой ожидаемой сохранности фиксированных 70% [34, 125], ДНК в образцах, этанолом что делает применение технологий третьего поколения. Очищенная неоправданным тотальная ДНК была обработана ультразвуком на Covaris M200 для получения фрагментов длиной 300 п.н. Библиотеки для секвенирования были подготовлены при помощи набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit и секвенированы с помощью набора Illumina NextSeq 550 Mid Output Kit v2.5 для получения одиночных (SE) прочтений.

2.3 Сборка митохондриальных геномов

необработанных Контроль качества данных секвенирования нового поколения выполняли с помощью компьютерной программы FastQC [16]. Удаление адаптерных последовательностей и фильтрация качества прочтений осуществляли в Trimmomatic v. 0.40 [23]. Сборка контигов из данных секвенирования проводили с использованием Mira v. 5 [38]. Полученные контиги визуализировали в геномном браузере Tablet [132]. Поиск митохондриальных контигов осуществляли среди контигов с наибольшим покрытием и высоким содержанием аденина и тимина путём поиска гомологии в международной базе генетических данных GenBank с помощью веб-интерфейса программы BLASTn. Для разрешения сложных и повторяющихся участков был разработан скрипт на языке Python 3, позволяющий извлекать из сырых данных секвенирования отдельные прочтения и конвертировать их в формат Fasta [155]. После чего прочтения были выравнены относительно друг друга с использованием программы Clustal Omega v. 1.2.4 [173]. Для оценки правильности сборки повторяющихся участков проводили рекурсивное картирование прочтений на собранный митохондриальный геном С использованием программы Bowtie2 v. 2.3.5.1 [108]. Геном считали собранным правильно при достижении равномерного покрытия по всей длине.

2.4 Аннотация митохондриальных геномов

Процесс de novo аннотации митохондриального генома был разделён на несколько этапов. Первым этапом была аннотация транспортных РНК при программы Aragorn v. 1.2.40 [110] помощи С опциями для поиска тРНК тРНК-пунктуации, митохондриальных Metazoa. Согласно теории перекрывающиеся гены аннотировали с сохранением целостности 5'-конца нижестоящего гена и сокращением 3'-конца вышестоящего гена. Вторым этапом проведена аннотация белок-кодирующих последовательностей, осуществлённая путём выявления открытых рамок считывания с использованием веб-интерфейса программы Expasy Translate [53] и митохондриального генетического кода Metazoa

GenBank). (таблица трансляции <u>№</u> 5, Полученные аминокислотные последовательности были аннотированы путём поиска гомологии В международной базе данных с использованием веб-интерфейса программы BLASTp. Согласно тРНК-пунктуации, теории белок-кодирующие последовательности были аннотированы с допущением перекрытия друг на друга, но без допущения перекрытия с генами тРНК. Последним этапом была проведена аннотация генов рибосомальной РНК с использованием программы barrnap [169]. Визуализацию аннотированных митогеномов выполняли В программе DNADynamo v. 1.614 [44] с последующей обработкой в Inkscape [86].

2.5 Филогенетический анализ и молекулярная делимитация таксонов

Для проведения реконструкции эволюционной истории акантобделлид был сформирован сбалансированный набор таксономически данных. сравнения² были Последовательности митохондриальных геномов группы загружены из международной базы генетических данных GenBank, критериями поиска которых стали длина генома не менее 14 000 п.н. и полный набор Ha было выбрано 69 митохондриальных генов. основе поиска последовательностей полных митохондриальных геномов (Приложение 1). Для Hirudinea были все доступные митогеномные (23)взяты данные последовательности), тогда как из 72 доступных в GenBank последовательностей Oligochaeta были отобраны 46, остальные были элиминированы в связи с дублированием отдельных образцов в базе данных. Во всех филогенетических реконструкциях митохондриальные геномы представителей Polychaeta были заданы в качестве внешней группы, для формирования которой из 209 доступных было отобрано восемь митогеномов представителей отрядов разных (Приложение 1).

Полученный набор данных был дополнен восьмью таксономически значимыми представителями группы сравнения. Четыре последовательности

² Эта группа состоит из гомологичных последовательностей, используемых в качестве эталона при определении сходства целевой группы, в отличие от внешней группы, необходимой для укоренения филогенетического древа [96]

представителей Annelida из GenBank не отвечали требованиям длины и не имели полного набора генов: Erpobdella octoculata MT410851, Haemopis sanguisuga MT862376, Piscicola geometra MT628553 и Theromyzon tessulatum MT862407. Два митогенома при соответствующей длине не имели набора полного аннотированных генов: Glossiphonia concolor MT628565 и Lumbriculus variegatus МТ628551. Кроме того, были найдены необработанные прочтения геномов Haemopis sanguisuga и Glossiphonia complanata, митохондриальные геномы которых отсутствовали в GenBank. Необработанные данные секвенирования нового поколения для всех восьми образцов были найдены в международной базе данных SRA. Процедура реконструкции и аннотации митохондриальных геномов на основе этих данных не отличалась от таковой для образцов, геномные прочтения которых получены в рамках данной работы. На сегодняшний день в международных базах данных отсутствуют какие-либо сведения о структуре полных митохондриальных геномов представителей отряда Branchiobdellida.

Для выравнивания последовательности были исследованы на предмет генных перестановок. В случае выявления таковых, последовательности были отредактированы таким образом, чтобы сохранить единый порядок генов для всех исследуемых организмов. После этого последовательности были выравнены с использованием программы Mafft v7.453 [92], с окончательным выравниванием сложных участков вручную.

Для оценки влияния длины генных фрагментов и метода реконструкции на топологию, длины ветвей и статистические поддержки деревьев, реконструкцию филогении проводили как для полных митохондриальных геномов, так и для маркерных фрагментов генов *12S* и *cox1*. В общей сложности было проведено 12 филогенетических реконструкций: 6 по методу максимального правдоподобия и 6 по байесовскому методу. При реконструкции по обоим методам все геномные фрагменты либо рассматривались как единый участок с гомогенной моделью замен, либо были сегментированы. В первом случае расчёт оптимальной модели замен выполнен с использованием jModelTest 2 [42]. Для определения оптимальной схемы сегментации использовали программу PartitionFinder2 [107].

Априорная схема сегментации полного митохондриального генома, заданная для PartitionFinder2, включала в себя разделение всей последовательности на фрагменты, соответствующие отдельным генам. Белок-кодирующие фрагменты были далее разделены по позициям кодонов, а участки генов рРНК и тРНК не подразделялись внутри себя. Фрагмент *cox1* также был разделён по позициям кодонов, а фрагмент *12S* был разделён на сегменты длиной 10 нуклеотидов.

Реконструкцию филогении по методу максимального правдоподобия проводили при помощи программы IQ-TREE v. 2.1.3 [134]. В данной работе были использованы консенсусные деревья на основе 1000 бутстреп-реплик, которые могут отличаться по топологии от единственного древа с максимальным Байесовская значением правдоподобия. реконструкция выведена С BEAST v. 2.6.4 [25] c логарифмически-расслабленными использованием молекулярными часами [46]. Сходимость байесовской статистики сверяли с использованием программы Tracer v. 1.7.1 [155]. Консенсусное древо было реконструировано в программе TreeAnnotator из пакета BEAST2 с удалением первых 10% деревьев. Графическое оформление древа проводили в программах FigTree v1.4.4 [58] и Inkscape v. 1.1.1 [86]. Сходство топологий полученных деревьев оценивали узловым («nodal») алгоритмом программы TOPD/FMTS v. 4.6 [152]. Данный алгоритм строит матрицу числа узлов, разделяющих каждую последовательность на древе. Затем матрицы для двух деревьев сравниваются и рассчитывается среднеквадратичное расстояние между ними. Параллельно с этим оценивается среднее расстояние от сравниваемых деревьев до деревьев со случайной топологией.

Для установления порогов внутривидовой вариабельности полученные филогенетические деревья были обработаны функцией GMYC [151] из пакета splits в статистической среде R.

Расчёт общих статистических характеристик нуклеотидных последовательностей и результатов реконструкции филогении проводили в программных средах R и Python3.

ГЛАВА 3. СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА АННЕЛИД

3.1 Характеристика данных секвенирования нового поколения

Ввиду отсутствия информации о приблизительных размерах геномов исследуемых нами организмов секвенирование 12 образцов было проведено в два Ha была секвенирована ДНК этапа. первом этапе четырех образцов акантобделлид: Б35, Б52, Б53 и Б56 (Таблицы 4, 6). После исследования выходных данных и пробной реконструкции митохондриальных контигов было установлено их избыточное покрытие и наличие возможности секвенирования геномов большего количества организмов за один прогон прибора. На втором этапе секвенирование проведено для остальных образцов акантобделлид и гирудинид: Б28, Б33, Б45, Б47, Б49, Б55, Б57 и Б58 (Таблицы 4, 6). Среднее число прочтений на образец на втором этапе секвенирования было в два раза ниже, чем на первом (таблица 6), однако прочтений было достаточно, чтобы реконструировать полные митохондриальные геномы 11 из 12 образцов.

Таблица 6 – Количество данных, полученных в ходе секвенирования нового поколения

Вид	Номер	Номер в	Тип прочтений	Количество
	образца	GenBank		прочтений
	Б28	MZ562997	SE	25 922 167
	Б33	OM203184	SE	22 658 714
Acanthobdella peledina	Б35	OM117616	SE	31 118 496
	Б52	OM203185	SE	50 236 214
	Б53	OM203186	SE	53 860 180
	Б55	OM214536	SE	18 024 105
Paracanthobdella livanowi	Б49	OM117614	SE	27 015 922
	Б56	OM117615	SE	38 049 622
Codonobdella sp.	Б45	MZ202177	SE	18 708 170
countration spi	Б47	нет	SE	19 269 602
Baicaloclepsis grubei	Б57	OM257165	SE	26 584 994
Baicaloclepsis echinulata	Б58	OM257166	SE	15 194 338

В ходе секвенирования было получено более 173 миллионов прочтений суммарно на каждом этапе. Стоит отметить, что большое число общих прочтений не гарантирует высокого покрытия митохондриального генома. Образец *Codonobdella* sp. Б47 имеет большее количество прочтений, чем родственный ему образец Б45 (Таблица 6), но при этом демонстрирует сильную деградацию митохондриального генетического материала, что не позволило в полной мере реконструировать его митохондриальный геном (см. Раздел 3.3). Содержание ГЦоснований в прочтениях образца *Codonobdella* sp. Б47 было выше (45%), чем у *Codonobdella* sp. Б45 (38%), что может свидетельствовать о большей сохранности ядерного генома по сравнению с митохондриальным в образце Б47, что согласуется с общим представлением о насыщенности миохондриальных геномов [6]. Вероятно, митохондриальная ДНК АТ-основаниями является более чувствительной к условиям фиксации и хранения образцов.

Для реконструкции эволюционной истории реликтовых пиявок в системе Annelida нам потребовались данные о полных митохондриальных геномах таксономически представленной группы сравнения. Однако имевшиеся в международной базе генетических данных GenBank последовательности аннелид во многих случаях оказались неполны или вовсе отсутствовали. Более того, слабая таксономическая представленность в GenBank группы Hirudinea усугубляется неполнотой митохондриальных (MT410851, MT862376, многих геномов МТ628553, МТ862407, МТ628565), где не достает от 1 000 до 7 500 нуклеотидов. В публично доступном митохондриальном геноме Lumbriculus variegatus (МТ628551), единственного представителя потенциально близкородственной акантобделлидам группы олигохет семейства Lumbriculudae, полностью отсутствует последовательность гена цитохрома В. Митогеномы пиявок *Heamopis* sanguisuga и Glossiphonia complanata отсутствуют в GenBank, однако их необработанные прочтения депонированы в базе SRA (Таблица 7).

Для формирования максимально наполненной группы сравнения были загружены необработанные данные секвенирования восьми образцов (Таблица 7), соответствующие сборки полных митохондриальных геномов которых нами были

реконструированы «с нуля». Все файлы содержали в себе парноконцевые прочтения. После обработки данных программой Trimmomatic [23] для удаления адаптеров, коротких и некачественных прочтений, были отобраны только парные прочтения. Данные об их количестве для каждого образца представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Количество данных, полученных в результате обработки публичных данных

Вид	Homep SRA	ер SRA Номер в		Количество
		GenBank	прочтений	прочтений
Glossiphonia complanata	SRX8928147	OM039422	PE	6 983 302
Glossiphonia concolor	SRX9009202	-	PE	19 694 880
Theromyzon tessulatum	SRX8928146	OM039423	PE	9 557 598
Piscicola geometra	SRX9009199	BK059172	PE	35 481 224
Erpobdella octoculata	SRX9009198	OM257408	PE	22 711 796
Haemopis sanguisuga	SRX9009141	OM234778	PE	9 300 088
Haemopis sanguisuga	SRX9009400	OM234779	PE	7 220 086
Lumbriculus variegatus	SRX9009164	OM062609	PE	45 269 190

Несмотря на то, что число прочтений на образец в публичных данных было меньше, чем для образцов акантобделлид и гирудинид, использованных в данной работе (таблица 6), для всех образцов, кроме *Haemopis sanguisuga* SRX9009400, удалось реконструировать полные митохондриальные геномы (см. Раздел 3.3).

3.2 Характеристика результатов геномной сборки

Выходные данные сборки «сырых» прочтений в контиги были проанализированы на предмет основных статистических показателей, такие как число получившихся контигов, их среднее покрытие (число прочтений в контиге, которые имеют конкретный нуклеотид реконструированной последовательности) и показатель N50 (наименьшая длина контига, равная или меньшая длины всех контигов, содержащих в себе 50% нуклеотидов сборки). Статистические показатели результатов геномной сборки использованных в работе образцов представлены в таблице 8.

Вид	Номер образца	Число контигов	Среднее покрытие	N50
	Б28	491 622	26,48	459
	Б33	380 282	195,28	440
A santhahdalla paladina	Б35	643 295	70,36	996
Acuninobuena pereaina	Б52	642 489	226,28	896
	Б53	634 709	44,26	943
	Б55	380 058	48,59	975
Paracanthobdella livanowi	Б49	566 108	39,60	973
	Б56	125 634	63,70	764
Codonobdella sp	Б45	282 539	62,30	945
couonobacia sp.	Б47	323 026	23,93	528
Baicaloclepsis grubei	Б57	450 235	65,65	381
Baicaloclepsis echinulata	Б58	152 709	13,92	444
Glossiphonia complanata	SRX8928147	69 873	107,25	607
Glossiphonia concolor	SRX9009202	952 946	35,50	456
Theromyzon tessulatum	SRX8928146	118 265	35,86	388
Piscicola geometra	SRX9009199	387 593	852,10	415
Erpobdella octoculata	SRX9009198	231 899	41,93	371
Haemopis sanguisuga	SRX9009141	216 384	42,89	629
Haemopis sanguisuga	SRX9009400	250 961	11,32	117
Lumbriculus variegatus	SRX9009164	246 237	30,71	892

Таблица 8 – Статистические характеристики результатов геномной сборки

Применение регрессионного анализа для выявления зависимости статистических показателей сборки от числа необработанных прочтений в исходных данных выявило, что только показатель среднего покрытия контигов существенно зависит от количества исходных данных. Показатель итогового числа контигов и показатель N50 прямо коррелируют с количеством необработанных прочтений, однако их зависимость намного менее выражена (Рисунок 5). Таким образом, показано, что простое увеличение числа прочтений не гарантирует получение бо́льшего числа более длинных контигов.



Рисунок 5 – Зависимость статистических показателей результатов геномной сборки от количества необработанных прочтений, где R^2 – это коэффициент детерминации. Статистические показатели нормализованы от 0 до 1.

3.3 Структура и порядок генов митохондриального генома аннелид

3.3.1 Общая характеристика аннотированных митохондриальных геномов

Природа полученных в результате сборки контигов была установлена путём поиска гомологии в международной базе генетических данных GenBank. Контиги были получены либо едиными фрагментами, либо выстроены в порядке, определённом их взаимным перекрытием, если это было возможно. В тех случаях,

когда перекрытие отсутствовало, контиги были выстроены на основе анализа и выравнивания прочтений, полученных напрямую из необработанных файлов с использованием специальной программы fastq-grep [55]. Все полученные митохондриальные геномы имели длину около 14,5-16,0 тыс. п. н., за исключением геномов *A. peledina* (Таблица 9).

Вид	Номер образца	Длина генома	ГЦ-состав (%)
	Б28	18 528	30,13
	Б33	16 708	29,44
A can the b della poleding	Б35	17 499	29,55
Acaninobaena pereama	Б52	16 388*	28,76
	Б53	17 271*	28,72
	Б55	16 547*	29,06
Paracanthobdella livanowi	Б49	15 500	29.93
	Б56	15 411	29,94
Codonobdella s p	Б45	14 486	24,48
Couonobuena sp.	Б47	14 573**	23,63
Baicaloclepsis grubei	Б57	14 751	23,19
Baicaloclepsis echinulata	Б58	15 120	22,92
Glossiphonia complanata	SRX8928147	15 468	24,39
Glossiphonia concolor	SRX9009202	15 575	25,47
Theromyzon tessulatum	SRX8928146	15 913	23,63
Piscicola geometra	SRX9009199	14 788	21,73
Erpobdella octoculata	SRX9009198	15 580	27,50
Haemopis sanguisuga	SRX9009141	14 530	22,15
Haemopis sanguisuga	SRX9009400	14 462**	22,18
Lumbriculus variegatus	SRX9009164	15 883	31,94

Таблица 9 – Длина митохондриальных геномов исследуемых образцов

* - количество и последовательность повторяющихся регионов недостаточно разрешены;

** - последовательности имеют невосстановимые пробелы.

Все образцы имели одинаковый набор ключевых генов, характерных для митохондриального генома многоклеточных животных. Практически все собранные нами геномы имели сходную композицию и порядок генов. Исключения составили митохондриальные геномы *L. variegatus*, *H. sanguisuga* и *T. tessulatum* (Приложение 2). Митохондриальные геномы *A. peledina* варьировали по длине в зависимости от образца (Таблица 9). Длина митогенома варьирует за счет длины контрольного региона и других некодирующих участков и не связана с длиной функциональных генов.

Реконструкция полных митохондриальных геномов *Codonobdella* sp. Б47 и *Haemopis sanguisuga* SRX9009400 оказалась невозможной ввиду разрушения митохондриального генетического материала и преобладания компонентов ядерного генома в данных прочтениях; невосстановимые пробелы в этих геномах составили 5,58% и 0,33% соответственно.

Полный список размеров реконструированных геномов и доля содержания в них гуанина и цитозина представлены в таблице 9. Среднее значение ГЦ-состава в митогеномах оказалось неоднородным. Для реликтовых пиявок отряда Acanthobdellida это значение составляет 29,44%. Все полученные значения ГЦсостава были сопоставлены с аналогичными значениями для группы сравнения, используемой при реконструкции филогении (Рисунок 6). Значения ГЦ-состава митогеномов акантобделлид заняли промежуточное положение между таковыми для олигохет и пиявок. При этом отмечается тренд к снижению процента ГЦоснований в предполагаемом эволюционном направлении от Oligochaeta к Hirudinea.

Отличительной особенностью митогенома A. peledina является наличие в нём повторяющегося участка, содержащего многократно псевдогенные последовательности *atp6*. В остальном набор и порядок генов A. peledina сходен с характерным для большинства других аннелид. В митогеномной последовательности малощетинкового червя L. variegatus наблюдается смена порядка генов, а именно перестановка генов цитохрома В (cytB), шестой субъединицы NADH-дегидрогеназы (nad6), транспортных РНК аргинина,
гистидина, глутамина и тирозина (Приложение 2). В обоих реконструированных нами митохондриальных геномах ложноконской пиявки *H. sanguisuga* имеется перестановка генов транспортных РНК глицина (trnG) и тирозина (trnY), а также отсутствует последовательность гена транспортной РНК аргинина (Приложение 2). В геноме *Theromyzon tessulatum* наблюдается перестановка гена транспортной РНК аргинина (trnR) и наличием вставки после гена третьей субъединицы NADHдегидрогеназы (*nad3*), которая может быть некодирующей, либо нести в себе дополнительный ген транспортной РНК серина (trnS) (Приложение 2).



Рисунок 6 – Значения доли гуанина и цитозина в митохондриальных геномах кольчатых червей (Annelida). Усы показывают крайние значения доли ГЦоснований не далее 1,5 межквартильных интервалов.

Множественные геномные перестройки у аннелид были также обнаружены в ходе анализа митохондриальных геномов, размещённых в GenBank (Приложение 2). Все представители почвенных олигохет и большинство пиявок имеют одинаковый порядок генов. Такой же порядок встречается в одном из родов полихет (Galathealinum) и в двух родах пресноводных олигохет (Tubifex и Limnodrilus). Замечено, что митохондриальный геном глоточной пиявки Erpobdella octoculata KC688270 имеет порядок генов, отличный от других представителей (Приложение 2). Данный образец своего рода отличается ОТ других представителей рода Erpobdella двумя генными перестановками (генов тРНК глицина и тирозина и тРНК серина и аланина), а от рода Whitmania – одной перестановкой генов тРНК серина и аланина, однако полностью идентичен представителям родов Hirudo и Hirudinaria. Среди всех проанализированных в данной работе митохондриальных геномов ЭТО единственный случай несовпадения порядка генов у представителей одного рода. Вероятно, порядок таксон-специфический паттерн. Исходя имеет ИЗ этого, генов можно предположить неверную таксономическую идентификацию образца Erpobdella octoculata KC688270, представленного в GenBank.

3.3.2 Аннотация митогенома Acanthobdella peledina

Митохондриальные геномы образцов реликтовой пиявки *A. peledina* из географически разрозненных мест обитания имеют разную длину, варьирующую в диапазоне 16 388 – 18 528 п.н. Исследованные геномы содержат консервативный для большинства представителей Metazoa набор из 13 белок-кодирующих генов, 22 генов транспортных PHK, генов малой (*12S*) и большой (*16S*) субъединиц рибосомальной PHK и контрольного региона. Все функциональные гены расположены на одной цепи (Рисунок 7).

В ходе аннотации митохондриальных геномов *A. peledina* были обнаружены множественные перекрытия между генами. Так, например, предсказанные границы генов trnE и trnP, а также trnY и trnG перекрываются на два нуклеотида. На один нуклеотид перекрываются границы генов trnC и trnM. Гены trnA и trnS2 перекрываются не только между собой, но и с окружающими их trnL1 и trnL2. Обнаружено, что среди белок-кодирующих последовательностей три пары генов

74

nad4L/nad4, nad6/cytB и nad2/cox1 перекрываются на 7, 8 и 24 нуклеотида соответственно. Перекрывающиеся гены были аннотированы в соответствии с теорией тРНК-пунктуации. При перекрытии двух генов тРНК нижестоящий ген был аннотирован как целостный, а вышестоящий был усечён с 3'-конца. При перекрытии генов тРНК и белок-кодирующих генов последние ограничивались генами тРНК. Перекрытие рамок считывания белок-кодирующих генов допускалось без изменений.



Рисунок 7 – Общая схема митохондриального генома реликтовых пиявок вида *Acanthobdella peledina*. Жёлтым цветом обозначены белок-кодирующие гены, голубым – гены тРНК, красным – гены рРНК, серым – контрольный регион и регион псевдогенных тандемных повторов.

Кроме того, программой Aragorn [110] было предсказано наличие двух тРНК-подобных структур, находящихся на комплементарной цепи ("-" цепь): trnYи *trnL*-подобные структуры, расположенные на участке, соответствующем гену cox1 смысловой цепи ("+" цепь). Предсказанный на антисмысловой цепи ген trnY образует тРНК-подобную структуру клеверного листа, а trnL формирует её вариант с отсутствующим D-плечом (Рисунок 8). Эти тРНК-подобные структуры, вероятно, не являются генами, так как предположение об их функциональности, скорее всего, несостоятельно, поскольку это потребовало бы процесса транскрипции смысловой цепи митогенома. Прежде подобные структуры никогда не указывались для других представителей Annelida. В свою очередь, наличие последовательности, предрасположенной к формированию структуры клеверного листа на одной цепи, говорит о присутствии аналогичной последовательности на комплементарной. Следовательно, в ходе процесса транскрипции в пределах рамки считывания гена *cox1* формируется тРНК-подобная структура, однако процессинг незрелой РНК в данной точке не происходит. Это указывает на способность процессирующих нуклеаз различать тРНК-подобные структуры и тРНК. функциональные Предсказанные тРНК-подобные структуры 31 перекрываются на нуклеотид, что также свидетельствует 0 неработоспособности этих структур.

В ходе работы по сборке митохондриальных контигов вида A. peledina был обнаружен фрагмент, препятствующий правильной сборке митохондриальной последовательности. Участок с аномально высоким покрытием и множеством конфликтующих вариантов нуклеотидов был обнаружен между 3'-концом гена шестой субъединицы АТФ-синтазы (*atp6*) и 5'-концом гена транспортной РНК аргинина (*trnR*) при анализе образца Б28 (Рисунок 7). Реконструкция данного участка проводилась путём выравнивания единичных прочтений до соединения концовки гена *atp6* и начала гена *trnR*. Прочтения для выравнивания каждый раз выбирали на основе соответствия их последовательностей большинству. В случае нахождения прочтений, разделявшихся на две и более группы по нуклеотидным заменам, все варианты комбинаций рассматривались параллельно. Корректность

сборки участка проверялась путём рекурсивного выравнивания прочтений на собранный митохондриальный геном. Последовательность считалась правильно собранной, когда достигалось равномерное покрытие, без несогласующихся со сборкой нуклеотидов.



Рисунок 8 – тРНК-подобные структуры на комплементарной цепи митохондриальной ДНК *Acanthobdella peledina*, аннотированные программой Aragorn [110].

Подобные участки тандемных повторов фрагментов генов *atp6* и *trnR* были обнаружены во всех исследованных образцах *A. peledina*. Использование финальной сборки митохондриального генома образца Б28 для сборки на основе референса показало, что данные участки у разных образцов *A. peledina* имеют разную длину (количество копий) и крайнюю неконсервативность этих участков. Исходя из этого, можно заключить, что данные участки, вероятнее всего, являются псевдогенами, появившимися в связи с неким рекомбинационным событием у

общего предка вида *A. peledina*. Примечательно, что у близкородственного вида *P. livanowi* отсутствует такой участок, что, скорее всего, свидетельствует о появлении этой структуры уже после дивергенции этих двух видов. Другим потенциальным объяснением повышенного покрытия на данном участке может служить существование его копий в ядерном геноме (NUMTs). Однако среди прочтений в этом участке не было обнаружено таких, которые бы имели своим продолжением фрагмент, отличающийся от следующих повторяющихся прочтений, или фрагментов функциональных генов *atp6* и *trnR*.

3.3.3 Аннотация митогенома Paracanthobdella livanowi

Митохондриальные геномы двух образцов вида *P. livanowi*, обитающего на Камчатке, составляют в длину 15 411 и 15 500 п.н. Геномы *P. livanowi*, как и геномы сестринского вида *A. peledina*, характеризуются консервативным для большинства представителей Metazoa набором, состоящим из 37 функциональных генов, 13 из которых являются белок-кодирующими генами, 22 – генами транспортных PHK, 2 – генами малой (*12S*) и большой (*16S*) субъединиц рибосомальной PHK, и контрольного региона. Все функциональные гены расположены на одной цепи (Рисунок 9). В отличие от митохондриального генома *A. peledina* в геноме камчатского вида отсутствует регион тандемных повторов фрагмента генов *atp6* и *trnR*. Различия в размерах митохондриальных геномов двух образцов связаны с вариациями длины контрольных регионов и не связаны с функциональными генами.

Как и в случае митохондриальных геномов A. peledina, в геномах P. livanowi были обнаружены множественные перекрытия генов. Согласно аннотации с использованием программы Aragorn [110], гены trnE и trnP перекрываются на три нуклеотида. Гены trnC и trnM, а также гены trnY и trnG прекрываются на один нуклеотид. Гены trnA и trnS2 перекрываются не только между собой, но и с окружающими их trnL1 и trnL2. Из белок-кодирующих генов nad4L и nad4перекрываются на семь нуклеотидов, nad2 и cox1 – на 23 нуклеотида, а nad6 и cytB– на восемь нуклеотидов.

78



Рисунок 9 – Общая схема митохондриального генома представителей вида *Paracanthobdella livanowi*. Жёлтым цветом обозначены белок-кодирующие гены, голубым – гены тРНК, красным – гены рРНК, серым – контрольный регион.

Порядок генов в митохондриальных геномах реликтовых пиявок *A. peledina* и *P. livanowi* отличается от порядка генов у *L. variegatus*, представителя семейства Lumbriculidae, потенциально наиболее близкой предковой группы относительно паразитических аннелид (пиявок и пиявкоподобных червей). Тем не менее, порядок генов акантобделлид аналогичен характерному для большинства представителей класса Clitellata, включая почвенных олигохет (Приложение 2). Таким образом, порядок генов может демонстрировать стабильность внутри родов

и семейств, однако корреляция между ним и принадлежностью к более крупным таксонам (отрядам, классам) не очевидна или отсутствует.

При аннотации тРНК программой Aragorn [110] было предсказано несколько тРНК-подобных структур на антисмысловой цепи. Три из них (*trnH*, *trnK* и структура с неполным антикодоном) были аннотированы в пределах контрольного региона, более чем за 409 нуклеотидов до гена *trnH*. Ещё одна структура, соответствующая варианту *trnI* с отсутствующим D-плечом, находится на участке комплементарной цепи, соответствующем гену *cox3*, расположенному на смысловой цепи (Рисунок 10).



Рисунок 10 – тРНК-подобные структуры на комплементарной цепи митохондриальной ДНК реликтовых пиявок *Paracanthobdella livanowi*, аннотированные программой Aragorn [110].

ГЛАВА 4. ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА АКАНТОБДЕЛЛИД

4.1 Филогения на основе маркерных фрагментов

4.1.1 Филогения на основе маркерного участка гена cox1

Общая длина выравнивания маркерного участка гена *cox1* составила 747 сайтов, из которых 294 (39,36%) оказались инвариантными, вариабельными – 453 (60,64%), из них филогенетически информативны 409 (54,75%), и 44 (5,89%) представляют единичные уникальные позиции.

При реконструкции ML-филогении с использованием как сегментированных, так и несегментированных наборов данных часть последовательностей Polychaeta, заданные *а priori* как аутгруппа, тем не менее, разместились внутри клады класса Clitellata (Приложения 3 и 4).

При построении ML-филогении на основе несегментированного выравнивания представители отряда Acanthobdellida сформировали кладу в парафилетичной группе бесхоботных пиявок (Arhynchobdellida), чего не наблюдается ни в одном другом анализе, включая литературные данные (Рисунок 11, Приложение 3). Бутстреп-поддержки узлов, соответствующих такой кластеризации, составляют 57% и ниже. Отряд Rhynchobdellida, напротив, сформировал монофилетичную кладу. Водные олигохеты с низкими поддержками сформировали парафилетичную группу в корне общей клады акантобделлид и пиявок.

При реконструкции максимально правдоподобного (ML) древа на основе сегментированных данных реликтовые пиявки сформировали филогенетическую линию, сестринскую истинным пиявкам (Hirudinea) (Рисунок 11, Приложение 4). Бесхоботные пиявки (Arhynchobdellida) образуют монофилетичную кладу внутри парафилетичной группы хоботных пиявок (Rhynchobdellida). Медианное значение бутстреп-поддержек снизилось по сравнению с реконструкцией на основе несегментированных данных. Водные олигохеты с низкими поддержками

сформировали парафилетичную группу в корне общей клады Acanthobdellida и Hirudinea, как и при ML-реконструкции на основе несегментированных данных.



Рисунок 11 – Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные ИЗ ML-деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов несегментированные cox1: слева справа данные, сегментированные данные. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, НА – бесхоботные пиявки.

При реконструкции байесовской филогении (BI)на основе несегментированных фрагментов *cox1* последовательности реликтовых пиявок внутри парафилетичной группы отряда Acanthobdellida формируют кладу Rhynchobdellida (Приложение 5), не ЧТО согласуется с современными представлениями о систематике поясковых кольчецов. Отряд Arhynchobdellida образует монофилетичную кладу, сестринскую общей кладе Rhynchobdellida и Acanthobdellida. Представители водных олигохет с высокой апостериорной поддержкой сформировали монофилетичную сестринскую кладу относительно единой филогенетической линии акантобделлид (Acanthobdellida) и истинных пиявок (Hirudinea). Результат реконструкции ВІ-филогении представлен на рисунке 12.

При ВІ-реконструкции на основе сегментированных последовательностей *cox1* представители хоботных пиявок (Rhynchobdellida) оказались полифилетичной группой (Рисунок 12, Приложение 6). Акантобделлиды не изменили своего положения, оставшись наиболее близкими к представителям

Rhynchobdellida. Как и в случае с использованием несегментрованных данных, ближайшей акантобделлидам к последовательностью оказалась последовательность хоботной пиявки Ozobranchus jantseanus. Представители Arhynchobdellida сформировали монофилетичную кладу, порядок ветвления которой идентичен таковому для древа по несегментированным данным. Водные олигохеты сформировали парафилетичную группу в корне клады Acanthobdellida и Hirudinea, однако, с более низкими поддержками, чем В случае С несегментированными данными. В остальном топологии оказались сходными, за исключением нескольких низко поддержанных перестановок в кладе рода Amynthas.



Рисунок 12 – Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные из ВІ-деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов *cox1*: слева – несегментированные данные, справа – сегментированные данные. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки.

Генетическая дистанция между видами *A. peledina* и *P. livanowi* составляет 13,96% ± 1,16 при внутривидовом гентическом полиморфизме равном 1,31% и 1,74% соответственно, что не противоречит теории ДНК-штрихкодирования [76] при делимитации таксонов на видовом уровне.

Применение алгоритма видовой делимитации GMYC к байесовскому древу на основе несегментированного выравнивания определило пороговое значение между внутри- и межвидовой вариабельностью (td) равным 0,015 и показало разбиение клады *A. peledina* на две оперативные таксономические единицы (ОТЕ) независимо ОТ географической приуроченности образцов (Таблица 4, Приложение 5): в первой сгруппировались образцы Б28, Б33, Б35 и Б52, а во второй образцы Б53 и Б55, однако объединение этих двух групп в один вид входит в доверительный интервал анализа. Представители *P. livanowi* кластеризовались в отдельную ОТЕ. Помимо этого, на древе было выявлены ОТЕ, состав которых не согласуется с видовой идентификацией входящих в них образцов: три вида пиявок рода Whitmania группируются в четыре ОТЕ, тогда как образцы вида Eisenia nordenskioldi формируют OTE (Приложение 5). При шесть анализе сегментированных данных максимально правдоподобный порог внутривидовой вариабельности оказался значительно ниже (td=0,0006), что, однако, в целом не повлияло на разграничение видов, за исключением объединения всех шести последовательностей A. peledina в одну ОТЕ (Приложение 6).

4.1.2 Филогения на основе маркерного участка гена 12S

Общая длина выравнивания маркерного участка гена *12S* составила 456 сайтов, из которых 94 (20,61%) содержали сайты с инсерциями и делециями у одной или более последовательностей, 78 позиций (17,11%) оказались инвариантными, а 354 (77,63%) – вариабельными, 312 из них филогенетически значимые, и 34 представляют уникальные нуклеотидные замены.

При анализе топологии деревьев, реконструированных по байесовскому методу на основе данного фрагмента, выявляются противоречия с современной систематикой кольчатых червей. Реконструкция на основе несегментированного выравнивания показала топологию, отличную от современных представлений об ЭВОЛЮЦИИ аннелид В нескольких принципиальных аспектах (Рисунок 13, сформировали Приложение 7). Последовательности реликтовых пиявок сестринскую ветвь монофилетичному отряду хоботных пиявок (Rhynchobdellida). Представители водных олигохет кластеризовались как сестринская группа всему классу Clitellata, за исключением двух представителей вида Olavius algarvensis,

кластеризовавшихся как сестринская группа монофилетичному отряду бесхоботных пиявок (Arhynchobdellida) и *Lumbriculus variegatus*, сестринского представителям почвенных олигохет. Стоит отметить, что из всех перечисленных ветвлений только кластеризация водных олигохет в корне Clitellata имеет высокую апостериорную поддержку.



Рисунок 13 – Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные из филогенетических деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов *12S*: слева – несегментированные данные (BI), справа – сегментированные данные (BI), снизу – общая схема ML-деревьев. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки.

При ВІ-реконструкции на основе сегментированного выравнивания представители отряда Arhynchobdellida формируют полифилетичную группу (Рисунок 13, Приложение 8). Акантобделлиды кластеризовались как сестринская рыбьих (Piscicolidae), полифилетичного клада пиявок части отряда Rhynchobdellida. Как и на древе без сегментации, водные олигохеты O. algarvensis кластеризуются как сестринская группа монофилетичной кладе Arhynchobdellida.

Из всех реконструкций это древо менее всего соответствует современным представлениям 0 систематике кольчецов, однако медианное значение апостериорных поддержек нём выше, чем деревьев В y на основе несегментированных данных (0,97 против 0,86 соответственно). Это указывает на возможность при помощи сегментации данных получить более высокую статистичекую поддержку неверной топологии.

Деревья, реконструированные по методу ML, имеют сходную топологию, вне зависимости от сегментации данных (Рисунок 13), различия есть только в близко расположенных узлах с низкими бутстреп-поддержками (Приложения 9 и 10). Все представители водных олигохет кластеризовались у корня класса Clitellata, нуклеотидных последовательностей кроме двух O. algarvensis, монофилетичной расположившихся внутри клады бесхоботных пиявок (Arhynchobdellida), и L. variegatus, который, как и при байесовской реконструкции кластеризовался у корня почвенных олигохет. Оба этих ветвления имеют высокие Реликтовые (Acanthobdellida) бутстреп-поддержки. пиявки В ланных реконструкциях с высокой бутстреп-поддержкой сформировали сестринскую кладу представителям подкласса Hirudinea, ближе к парафилетичной группе хоботных пиявок (Rhynchobdellida).

Топологии ВІ- и МL-деревьев, выведенные на основе *12S* последовательностей, не согласуются в определении филогенетического положения реликтовых пиявок (Acanthobdellida) (Рисунок 13).

Генетическая дистанция между видами *A. peledina* и *P. livanowi* составляет 6,52% ± 1,10 при внутривидовом гентическом полиморфизме равном 0,43% и 0,54% соответственно.

Применение алгоритма GMYC ультраметрическим ВІ-деревьям, К реконструированным основе сегментированного, как на так И порогового несегментированного выравниваний, показало чрезмерный сдвиг вариабельности 0.32 внутривидовой к корню (td значения = ДЛЯ несегментированных и 0,23 для сегментированных данных), что приводит к кластеризации в ОТЕ представителей целых семейств.

Анализ на основе коротких маркерных фрагментов митохондриальных генов *cox1* и *12S* выявил нестабильность топологии филогенетических деревьев и их несоответствие современным представлениям об эволюции и систематике кольчецов. Низкие значения статистических поддержек узлов указывают на недостаточную филогенетическую информативность этих фрагментов при анализе данной группы организмов. В то же время, делимитация видов с помощью алгоритма GMYC даёт наиболее точные предсказания при анализе деревьев на основе гена *cox1*.

4.2 Филогения митохондриальных геномов

Общая длина нуклеотидного выравнивания полных митохондриальных геномов составила 24 859 сайтов, из которых минимум 11 368 (45,73%) составляли сайты с инсерциями или делециями, 5082 (20,44%) – инвариантные сайты, вариабельные – 15 874 позиции (63,86%), из них 13 573 (54,6%) филогенетически информативных сайта и 1766 (7,1%) единичных уникальных замен.

ВІ-филогении, реконструированные на основе сравнения полных митохондриальных геномов, практически идентичны, независимо от применения или неприменения сегментации данных, и имеют топологию, наиболее близкую к современным представлениям о систематике аннелид (Приложения 11 и 12). Водные сформировали монофилетичную олигохеты кладу, сестринскую олигохетам, за исключением вида L. variegatus, который почвенным кластеризуется ближе к общей кладе реликтовых (Acanthobdellida) и истинных пиявок (Hirudinea). В свою очередь, Acanthobdellida формируют монофилетичную кладу, сестринскую по отношению к Hirudinea (Рисунок 14). Внутри последнего наблюдается чёткое разделение на монофилетичные клады, соответствующие отрядам Rhynchobdellida и Arhynchobdellida. Примечательно, что Arhynchobdellida, в свою очередь, делятся на клады челюстных и глоточных пиявок, за исключением Erpobdella octoculata KC688270, кластеризованного вместе с представителями рода Whitmania, что может указывать на неверную идентификацию данного образца. Однако положение этого образца на филогенетическом древе не

который согласуется с результатами анализа последовательности генов, порядка генов, характерную семейства демонстрирует идентичность ДЛЯ несколько Hirudinidae. Кроме того, было обнаружено других примеров неверной таксономической идентификации образцов, потенциально последовательности которых депонированы в GenBank. В непосредственной близости от образца Erpobdella octoculata КС688270, внутри клады рода Whitmania кластеризуется образец Hirudinaria manillensis КС688268. Образец *Hirudo nipponia* КС667144 располагается отдельно от двух других представителей рода *Hirudo*, ближе к образцам семейства Haemopidae. Внутри клады олигохет рода Amynthas на древе встречаются образцы, определённые как Metaphire californica, Metaphire vulgaris, Duplodicodrilus schmardae u Metaphire hilgendorfi.



Рисунок 14 – Упрощенная схема кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенная из филогенетических деревьев, полученных на основе сравнения полных митогеномов. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки.

Топология деревьев, реконструированных по методу ML, практически не отличается от таковой для байесовских деревьев (Приложения 13 и 14). Использование нём сегментации изменяет В лишь положение последовательностей олигохеты O. algarvensis. Без использования сегментации последовательности кластеризуются сестринская ЭТИ как клада всех

представителей Clitellata, тогда как сегментация приводит к их кластеризации с водными олигохетами вблизи корня клады почвенных олигохет. В обоих случаях поддержки узлов имеют относительно низкие значения (67% и 76% соответственно).

Важным результатом, полученным в ходе реконструкций, является монофилия отрядов Rhynchobdellida и Arhynchobdellida, которая отвергалась авторами ранних работ [17, 171, 184, 185] и была единожды подтверждена с использованием мультилокусного анализа на основе данных секвенирования нового поколения [150]. Данный факт указывает на повышение сходства и стабильности топологий филогенетических схем С увеличением объёма использованных для реконструкции данных, что отражается на статистических поддержках узлов (бутстреп и апостериорных) вне зависимости от метода реконструкции и применения сегментации данных.

Применение сегментации при реконструкции ВІ-филогении привело к изменению положения отдельных образцов. Так, например, образец *Whitmania acranulata* KM655838 отделяется от других представителей своего вида и располагается у корня клады всего рода *Whitmania*. При этом никак не изменяется апостериорная поддержка узлов в данной кладе. Поскольку как минимум одна из полученных топологий этой клады является ложной, в данном случае наблюдается пример высокой статистической поддержки неверной топологии. Оба ML-древа, независимо от сегментации, согласуются с топологией ВІ-древа на основе несегментированных митогеномов. Кроме этого, внутри клады рода *Amyntas* (почвенные олигохеты) изменяется положение пары образцов *Metaphire guillelmi* KT429017 и *Metaphire vulgaris* KJ137279, однако в данном случае это сопровождается повышением апостериорных поддержке внутри клады.

В свою очередь, при анализе порядка ветвления внутри клады челюстных пиявок (Hirudiniformes) наблюдается противоречие современной систематике на уровне семейств. Представители рода *Whitmania* формируют монофилетичную кладу, отдельную от других представителей семейства Наеторіdae. Таким образом, Наеторіdae формирут полифилетичную группу, что может быть связано

с неверной таксономической идентификацией некоторых образцов. В то же время, значения генетических дистанций внутри группы челюстных пиявок сопоставимы с дистанциями внутри семейств Erpobdellidae, Piscicolidae и Glossiphoniidae, что может указывать на необоснованность деления группы челюстных пиявок на отдельные семейства.

Генетическая дистанция между видами *A. peledina* и *P. livanowi* составляет 15,15% ± 0,27 при внутривидовом гентическом полиморфизме равном 2,14% и 1,88% соответственно.

Применение алгоритма видовой делимитации GMYC к байесовским деревьям как на основе сегментированного, так и на основе несегментированного выравнивания показало чрезмерный сдвиг порогового значения внутривидовой вариабельности к листьям, и как следствие, чрезмерное дробление организмов на OTE. В группы были объединены только организмы, для которых длина разделяющих их ветвей близка к нулю. Таким образом, филогенетические деревья, реконструированные на основе гена *cox1*, остаются наиболее оптимальными для делимитации видов, несмотря на то, что они не способны достоверно и стабильно отражать эволюцию таксонов высокого ранга.

4.3 Сравнение результатов филогенетической реконструкции

Реконструкция молекулярной филогении на основе трёх разных генетических фрагментов показала различные топологии филогенетических уровни их статистической поддержки деревьев и различные ДЛЯ всех использованных методов реконструкции. Наибольшее сходство с современными представлениями об эволюции и таксономии поясковых кольчецов (Clitellata) показали деревья на основе полных митохондриальных геномов. Эти деревья демонстрировали наивысшие значения бутстреп- и апостериорных поддержек узлов по сравнению с остальными (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Распределения значений бутстреп-поддержек (слева) и байесовских апостериорных поддержек (справа) в зависимости от используемого генного фрагмента и способа его обработки. Значения бутстреп-поддержек масштабированы от 0 до 1.

Деревья, реконструированные на основе коротких маркерных фрагментов cox1 12S, И показывают множественные И различные несоответствия современным представлениям о систематике кольчатых червей. Эти маркеры демонстрируют удовлетворительную разрешающую способность на уровне видов и родов, однако неприменимы для анализа древних эволюционных событий. В целом, все без исключения филогенетические схемы различались по своей топологии в большей или меньшей степени. Значения узловых дистанций между топологиями варьируются от 0,87 до 3,68 (Рисунок 16), при значении 5±0,38, соответствующем средней дистанции до древа со случайной топологией.



Рисунок 16 – Тепловая карта узловых дистанций между топологиями филогенетических деревьев. Кладограммы на схеме отражают результаты кластерного анализа сходства топологий.

Из полученных значений дистанций видно, что использованный геномный фрагмент и метод реконструкции оказывают гораздо большее влияние на топологию, чем наличие или отсутствие сегментации. Следует отметить, что узловой метод расчёта дистанций между топологиями не делает различий в значимости между слабо и сильно поддержанными перестановками, так же как не делает различий между мелкими перестановками, не противоречащими систематике, и крупными перестановками, конфликтующими с таксономией высокого уровня.

92

Сегментация данных и расчёт отдельных моделей замен для сегментов, сгруппированных программой PartitionFinder2, оказывают значительно больший эффект на длины ветвей деревьев, чем на их топологию. При реконструкции филогении по байесовскому методу сегментация значительно сокращает длины ветвей для всех использованных генных фрагментов. Противоположный эффект наблюдается при реконструкции по методу максимального правдоподобия – длина деревьев, построенных на основе сегментированных данных, больше для всех использованных в реконструкции генных фрагментов (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Зависимость длины древа (суммы длин всех ветвей) от метода реконструкции и сегментации данных.

Полученные филогенетические деревья в разной мере соответствуют различным гипотезам об эволюции кольчатых червей. Гипотезы и соответствие им деревьев суммированы в таблице 10.

При обработке филограмм алгоритмом видовой делимитации GMYC наиболее близкое соответствие предсказанных ОТЕ реальным таксономическим группам получилось при использовании деревьев на основе гена *cox1*. Деревья на основе полных митохондриальных геномов, хоть и имеют топологию, макимально

соответствующую современной систематике, при обработке данным алгоритмом продемонстрировали чрезмерное разделение организмов на ОТЕ. Деревья на основе гена *12S* показали топологию, не соответствующую современной таксономии, а также чрезмерное объединение видов в ОТЕ.

Таблица 10 – Соответствие реконструированных филогенетических деревьев различным гипотезам об эволюции аннелид

	МΓ		МΓ		coxl		coxl		12S		12S	
Гипотеза \ Деревья	сегм.				сегм.				сегм.			
	ML	BI	ML	BI	ML	BI	ML	BI	ML	BI	ML	BI
Предок Clitellata – вод- ный организм	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Предок Acanthobdellida и Hirudinea – водный организм	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Монофилетичность Rhynchobdellida	+	+	+	+	-	-	+	*	-	-	-	+
Монофилетичность Arhynchobdellida	+	+	+	+	+	+	+	+	**	-	**	+
Acanthobdellida – сест- ринская группа Hirudinea	+	+	+	+	-	-	-	-	**	-	**	-

Примечания: МГ – митогеном; «+» – древо соответствует гипотезе; «-» – древо не соответствует гипотезе; «*» – древо в целом соответствует гипотизе за исключением положения *O. jantseanus*; «**» – древо в целом соответствует гипотизе за исключением положения *O. algarvensis*.

Таким образом, деревья на основе полных митохондриальных геномов проявили себя как надёжный инструмент для выяснения эволюционных взаимоотношений средней и большой давности, однако оказались неприменимы для разграничения видов по алгоритму GMYC. Деревья на основе гена cox1 показали сравнительно точную топологию на уровне родов и семейств и неточную топологию на более высоких уровнях, однако оказались наиболее точными для делимитации видов по алгоритму GMYC. Деревья на основе гена 12S, как и деревья на основе cox1, показали сравнительно точную топологию на уровне одов и семейств, однако оказались неприменимы для делимитации таксонов по GMYC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы проведено полногеномное секвенирование, реконструкция и аннотация последовательностей митохондриальных геномов 12 образцов, принадлежащих видам Acanthobdella peledina, Paracanthobdella livanowi, Codonobdella sp., Baicaloclepsis grubei и Baicaloclepsis echinulata. Дополнительно заново реконструированы и аннотированы митохондриальные геномы 8 аннелид, частичные последовательности которых ранее были GenBank, опубликованы В международной базе генетических данных необработанные данные которых доступны в базе SRA.

Большая часть доступных на сегодняшний день митогеномов поясковых кольчецов (Clitellata) имеет сходную длину (около 16 тысяч нуклеотидов) и консервативный набор из 37 генов, характерный для большинства Metazoa. У некоторых рассмотренных групп выявлены перестановки функциональных генов, по-видимому, имеющие таксон-специфический паттерн. Во всех аннотированных геномах обнаружены случаи перекрытия функциональных генов, что согласуется с литературными данными.

В митохондриальных геномах реликтовых пиявок *A. peledina* обнаружен уникальный регион с многократными тандемными повторами фрагментов генов *atp6* и *trnR*, имеющий неконсервативную длину и структуру у образцов из разных географических районов Северной Евразии, что, скорее всего, свидетельствует о его нефункциональности. Подобный регион отсутствует у сестринского вида *P. livanowi*, что указывает на его формирование после дивергенции этих видов.

На основе полученных молекулярно-генетических данных был проведён анализ эволюционных взаимоотношений различных таксономических групп кольчатых червей, а также влияния заданных начальных параметров анализа на характеристики конечных филограмм. Использование коротких маркерных последовательностей митохондриальных генов *cox1* и *12S* показало расхождение топологий полученных деревьев с рядом представлений об эволюции поясковых кольчецов. При этом ряд значений бутстреп- и байесовских апостериорных поддержек на данных филограммах имеют очень низкие значения, что указывает Наибольшее на недостоверность полученных топологий. соответствие современным представлениям о систематике и эволюции кольчатых червей показали деревья на основе полных митохондриальных геномов. Независимо от метода реконструкции и применения или неприменения сегментации набора данных, филогенетические деревья различались лишь в порядке ветвления близкородственных организмов. Примечательно, что несоответствие положения образца Erpobdella octoculata KC688270 своему таксономическому определению на данных филограммах согласуется с результатами анализа порядка генов, указывающего на большее родство данного образца с пиявками семейства Hirudinidae, что говорит о высокой вероятности его неверной идентификации авторами последовательности, выложенной в GenBank. Кроме того, топология всех деревьев на основе полных митогеномов поддерживает монофилию отрядов Rhynchobdellida И Arhynchobdellida, оспаривая результаты ранних филогенетических исследований на основе малого количества коротких генетических маркеров и подтверждая выводы, полученные на основе анализа массивных данных (свыше 50 тысяч нуклеотидов). Проведенный анализ полных митохондриальных геномов подтвердил подразделенность отряда бесхоботных пиявок (Arhynchobdellida) на монофилетичные клады, соответствующие подотрядам глоточных (Erpobdelliformes) и челюстных (Hirudiniformes) пиявок. На уровне семейств выявлены проблемы классификации последних. Так, согласно современной классификации, роды *Haemopis* и *Whitmania* принадлежат семейству Haemopidae. Однако при реконструкциях на основе полных митохондриальных геномов они формируют полифилетичную группу, разделённую представителями рода Hirudinidae.

Топологии филограмм на основе широко используемого для видовой делимитации фрагмента гена *cox1* показали несоответствие систематике высоких таксонов поясковых кольчецов. Применение алгоритма видовой делимитации GMYC к данным деревьям выявило наибольшее соответствие предсказанных таксономических единиц идентифицированным видам. Следовательно, маркерный фрагмент *cox1* может быть успешно использован для разграничения криптических видов, однако он должен с осторожностью применяться для филогенетического анализа.

Установлено, что главным фактором, влияющим на топологию филогенетических деревьев, является использованный для их реконструкции метод. Деревья на основе одинаковых наборов молекулярно-генетических данных, реконструированные разными методами, могут больше отличаться друг от друга, чем от деревьев, реконструированных на основе других маркеров. Вторым по важности фактором оказалась природа использованного генетического фрагмента. Применение сегментации оказывало минимальное влияние на топологию филограмм. При исследовании суммарной длины ветвей полученных деревьев было установлено, что сегментация набора данных оказывает на неё противоположное влияние в зависимости от метода реконструкции: при использовании метода максимального правдоподобия сегментация увеличивает длину древа, тогда как при использовании байесовского метода длина древа на основе сегментированных последовательностей меньше.

В данной работе были использованы все доступные митогеномные данные организмов, принадлежащих к потенциально предковым группам относительно пиявкоподобных сегодняшний пиявок И паразитов. Однако на день представленность данной таксономической группы в базах генетических данных остаётся довольно скудной. В перспективе для построения более подробной Clitellata требуется картины ЭВОЛЮЦИИ пополнение базы данных последовательностями митохондриальных геномов водных олигохет. Особый интерес вызывают последовательности митогеномов представителей семейства Lumbriculudae таких родов, как Lamprodrilus, Phagodrilus и Agriodrilus, морфологически наиболее сходных с реликтовыми пиявками. Получение отсутствующих на сегодняшний день данных о структуре митогеномов группы пиявкоподобных червей Branchiobdellida, имеющих неопределенное положение в Clitellata, сформировать более системе В будущем поможет детальное представление об эволюции поясковых кольчецов.

97

Использованный в данной работе метод секвенирования геномов не специфичен к происхождению генетического материала, поэтому полученный массив данных, кроме митохондриальных последовательностей, включает и массу прочтений ядерного генома. Эти материалы не были использованы в данной работе, но в дальнейшем могут быть пригодны для получения более детальных сведений о механизмах адаптации организмов к их среде обитания и экологической нише, а также для поиска метаболических путей, образующих биологически-активные соединения, потенциально полезные для медицины и биотехнологии.

выводы

1. Впервые у кольчецов обнаружен регион с тандемными повторами псевдогенных последовательностей *atp6* и *trnR*, который является уникальной структурной особенностью вида *Acanthobdella peledina* и причиной вариабельности размера митохондриального генома у образцов из географически разрозненных популяций.

2. Показано, что различия в длине нуклеотидных последовательностей образцов митохондриальных геномов камчатских реликтовых пиявок Paracanthobdella livanowi связаны С индивидуальной изменчивостью В контрольном регионе митогенома и не затрагивают функциональных генов.

3. Впервые отмечено, что, несмотря на крайне консервативный набор функциональных митохондриальных генов у поясковых кольчецов, порядок их расположения имеет таксон-специфический паттерн на уровне семейств.

4. Использование полных митохондриальных геномов ДЛЯ построения филогении демонстрирует увеличение стабильности топологий филограмм, что отражается в повышении статистических поддержек узлов, по сравнению с короткими фрагментами маркерных генов вне зависимости OT метода реконструкции и сегментации набора данных.

5. Реконструкция эволюционной истории на основе полных митохондриальных геномов подтвердила гипотезу о древних щетинконосных пиявках (Acanthobdellida) как промежуточной форме между Oligochaeta и Hirudinea.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бауер, О. Н. К познанию паразитов рыб реки Анадырь / О.Н. Бауер, Н.П. Никольская // Известия Всесоюзного научно-исследовательского института озерного и речного рыбного хозяйства. – 1948. – Т. 27. – С. 175-176.
- 2 Быховская-Павловская, И. Е. Определитель паразитов пресноводных рыб СССР / И. Е. Быховская-Павловская [и др.]. – М.-Л. : Изд-во Академии наук СССР, 1962. – 776 с.
- 3 Ливанов, Н. А. Acanthobdella peledina Grube, 1851. Морфологическое исследование / Н.А. Ливанов // Ученые записки Казанского университета. – Т. 22. – С. 1-271.
- 4 Лукин, Е. И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов (Фауна СССР. Пиявки) /
 Е. И. Лукин. Ленинград : Наука, 1976. Т. 1. 484 с.
- 5 Матвеев, А. Н. Новые данные о распространении древней пиявки Acanthobdella peledina Grube, 1851 (Hirudinea) / А. Н. Матвеев, Н. М. Пронин // Известия Иркутского Государственного Университета. – 2010. – Т. 3(3). – С. 89-91.
- 6 Минченко, А. Г. Митохондриальный геном / А. Г. Минченко, Н. А. Дударева. Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 194 с.
- 7 Пронин, Н. М. Распространение Acanthobdella peledina Grube, 1851 (Hirudinea)
 паразита лососевых рыб в водоёмах СССР / Н. М. Пронин // Паразитология.
 1971. Т. 10, №5. С. 92-97.
- 8 Пронин, Н. М. Нахождение субарктических пиявок *Acanthobdella peledina* и Cystobranchus Mamillatus в бассейне озера Байкал и причины отсутствия их в Байкале / Н. М. Пронин // Паразитология. 1979. Т. 13, № 5. С. 555-558.
- 9 Чекановская, О. В. Водные малощетинковые черви фауны СССР / О. В. Чекановская. – М.-Л. : Изд-во АН СССР, 1962. – Т. 78. – 411 с.
- 10 Эпштейн, В. М. Acanthobdella livanowi sp. n. Новый вид древних пиявок (Archihirudinea) из водоёмов Камчатки / В. М. Эпштейн // Доклады Академии наук СССР. 1966. Т. 168(4). С. 955-958.

- 11 Эпштейн, В. М. Тип кольчатые черви Annelida (Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР) / В. М Эпштейн; под общ. ред. О. Н. Бауер. – Л. : Наука, 1987. – Т. 3(2). – С. 340-349.
- 12 Alberts, B. Molecular Biology of the Cell (4th Ed.) / B. Alberts B., A. Johnson, J. Lewis [et al.]. New York: Garland Science, 2002. 1462 p.
- 13 Alexander, M. Mitogenomic analysis of a 50-generation chicken pedigree reveals a rapid rate of mitochondrial evolution and evidence for paternal mtDNA inheritance / M. Alexander, S. Y. W. Ho, M. Molak [et al.] // Biology Letters. 2015. V. 11(10). 20150561.
- 14 Anderson, S. Sequence and organization of the human mitochondrial genome / S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell [et al.] // Nature. 1981. V. 290. P. 457-465.
- 15 Andreu-Sánchez, S. Multiple origins of a frameshift insertion in a mitochondrial gene in birds and turtles / S. Andreu-Sánchez, W. Chen, J. Stiller, G. Zhang // GigaScience. - 2020. - V. 10. - P. 1-11.
- 16 Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
 [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
- 17 Apakupakul, K. Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences / K. Apakupakul, M. E. Siddall, E. M. Burreson // Molecular Phylogenetics and Evolution. 1999. V. 12(3). P. 350-359.
- 18 Awadalla, P. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA / P. Awadalla, A. Eyre-Walker, J. Maynard-Smith // Science. – 1999. – V. 286. – P. 2524-2525.
- 19 Barcode Of Life Data System [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.boldsystems.org/
- 20 Bazin, E. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals / E. Bazin, S. Glémin, N. Galtier // Science. 2006. V. 312(5773). P. 570-572.

- 21 Beilecki, A. New data about the functional morphology of the chaetiferous leech-like annelids *Acanthobdella peledina* (Grube, 1851) and *Paracanthobdella livanowi* (Epshtein, 1966) (Clitellata, Acanthobdellida) / A. Bielecki, J. Maria Cichocka, I. Jelen [et al.] // Journal of Morphology. 2013. V. 275(5). P. 528-539.
- 22 Bleidorn, C. Mitochondrial genome and nuclear sequence data support Myzostomida as part of the Annelid radiation / C. Bleidorn, I. Eeckhaut, L. Podsiadlowski [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – V. 24(8). – P. 1690-1701.
- 23 Bolger, A. M. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. 2014. V. 30(15). P. 2114-2120.
- 24 Boore, J. L. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris* / J. L. Boore, W. M. Brown // Genetics. 1995. V. 141. P. 305-319.
- 25 Bouckaert, R. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis / R. Bouckaert, T. G. Vaughan, J. Barido-Sottani [et al.] // PLOS Computational Biology. – 2019. – V. 15(4). – e1006650.
- 26 Boussau, B. Efficient Likelihood Computations with Nonreversible Models of Evolution / B. Boussau, M. Gouy // Systematic Biology. 2006. V. 55(5). P. 756-758.
- 27 Boxma, B. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen / B. Boxma, R. M. de Graaf, G. W. M. van der Staay [et al.] // Nature. 2005. V. 434. P. 74-79.
- 28 Breinholt, J. W. Phylotranscriptomics: Saturated Third Codon Positions Radically Influence the Estimation of Trees Based on Next-Gen Data. // J. W. Breinholt, A. Y. Kawahara // Genome Biology and Evolution. – 2013. – V. 5(11). – P. 2082-2092.
- 29 Brennicke, A. The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants / A. Brennicke, L. Grohmann, R. Hiesel [et al.] // FEBS Letters. – 1993. – V. 325(1-2). – P. 140-145.

- 30 Brinkhurst, R. O. Did the lumbriculids provide the ancestors of the branchiobdellidans, acanthobdellidans and leeches? / R. O. Brinkhurst, S. R. Gelder // Hydrobiologia. – 1989. – V. 180. – P. 7-15.
- 31 Brinkhurst, R. O. Lumbriculids, branchiobdellidans and leeches: an overview of recent progress in phylogenetic research on clitellates / O. R. Brinkhurst // Hydrobiologia – 1999. – V. 406. – P. 281-290.
- 32 Canard, B. DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags /
 B. Canard, R. S. Sarfati // Gene. 1994. V. 148(1). P. 1-6.
- 33 Caricasole, A. A novel rat gene encoding a Humanin-like peptide endowed with broad neuroprotective activity / A. Caricasole, V. Bruno, I. Cappuccio [et al.] // The FASEB Journal. – 2001. – V. 16(10). – P. 1331-1333.
- 34 Carter, J. D. The Effects of Preservation and Conservation Treatments on the DNA of Museum Invertebrate Fluid Preserved Collections: дисс. ... магистра философии / J. D. Carter Cardiff, 2003. 136 p.
- 35 Castresana, J. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals / J. Castresana // Molecular Biology and Evolution. – 2001. – V. 18. – P. 465-471.
- 36 Cavalier-Smith, T. A six-kingdom classification and a unified phylogeny /
 T. Cavalier-Smith. Berlin : De Gruyter, 1983. P. 1027–1034.
- 37 Cavalier-Smith, T. Eukaryotes with no mitochondria / T. Cavalier-Smith // Nature. 1987. V. 326. P. 332-333.
- 38 Chevreux, B. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information / B. Chevreux, T. Wetter, S. Suhai // Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB) 99. – 1999. – P. 45-56.
- 39 Clark, C. G. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica* / C. G. Clark, A. G. Roger // PNAS. 1995. V. 92. P. 6518-6521.
- 40 Clary, D. O. The *Drosophila* mitochondrial genome / D. O. Clary,
 D. R. Wolstenholme // Oxf. Surv. Eukaryot. Genes. 1984. V. 1. P. 1-35.

- 41 Dahm, A. G. Distribution and biological patterns of *Acanthobdella peledina* Grube from Sweden (Hirudinea, Acanthobdella) / A. G. Dahm // Lunds universitets årsskrift, N. F., avd. 2. – 1962. – V. 58(10). – P. 1-36.
- 42 Darriba, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing / D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, D. Posada // Nature Methods. 2012. V. 9(8). 772.
- 43 Breinholt, J. W. Phylotranscriptomics: Saturated Third Codon Positions Radically Influence the Estimation of Trees Based on Next-Gen Data // J. W. Breinholt, A. Y. Kawahara // Genome Biology and Evolution. – 2013. – V. 5(11). – P. 2082-2092.
- 44 DNA Sequencing and Analysis Software. [Электронный ресурс] Режим доступа: <u>https://www.bluetractorsoftware.com/</u>
- 45 Doublet, V. Large gene overlaps and tRNA processing in the compact mitochondrial genome of the crustacean *Armadillidium vulgare* / V. Doublet, E. Ubrig, A. Alioua [et al.] // RNA Biology. – 2015. – V. 12(10). – P. 1159-1168.
- 46 Drummond, A. J Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence / A. J. Drummond, S. Y. W Ho, M. J. Phillips, A. Rambaut // PLOS One. 2006. V. 4(5). E88.
- 47 Dudek, J. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks / J. Dudek, P. Rehlinga, M. van der Laan // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research. 2013. V. 1833(2). P. 274-285.
- 48 Eid, J. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules / J. Eid,
 A. Fehr, J. Gray [et al.] // Science. 2009. V. 323(5910). P. 133-138.
- 49 Embley, T. M. Eukaryotic evolution, changes and challenges / T. M. Embley,
 W. Martin // Nature. 2006. V. 440. P. 623-630.
- 50 Embley, T. M. Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates / T. M. Embley, B. J. Finlay, P. L. Dyal [et al.] // Philosphical Translations of the Royal Society B. – 1995. – V. 262. – P. 87-93.
- 51 Erixon, P. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics / P. Erixon, B. Svennblad, T. Britton [et al.] // Syst. Biol. 2003. V. 52(5). P. 665-673.

- 52 Erséus, C. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida) / C. Erséus, M. Källersjö //
 Zoologica Scripta. 2004. V. 33(2). P. 187–196.
- 53 Expasy Translate [Электронный ресурс] Режим доступа: <u>https://web.expasy.org/translate/</u>
- 54 Eyre-Walker, A. How clonal are human mitochondria? / A. Eyre-Walker, N. H. Smith // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 1999. V. 266. P. 477-483.
- 55 fastq_grep[Электронныйресурс] Режимдоступа:https://github.com/bolbatav/fastq_grep
- 56 Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: maximum likelihood approach / J. Felsenstein // J. Mol. EV. 1981. V. 17(6). P. 368-376.
- 57 Felsenstein, J. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters / J. Felsenstein // Am. J. Hum. Genet. – 1973. – V. 25. – P. 471-492.
- 58 FigTree Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <u>http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/</u>
- 59 Fisher, C. Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel Mytilus / C. Fisher, D. O. F. Skibinski // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 1990. – V. 242. – P. 149-156.
- 60 Fitch, W. M. Toward defining the course of evolution / W.M. Fitch // Syst. Biol. 1971. V. 20(4). P. 406-416.
- 61 Galtier, N. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal / N
 . Galtier, B. Nabholz, S. Glemin, G. D. D. Hurst // Molecular Ecology. 2009. –
 V. 18. P. 4541-4550.
- 62 Galtier, N. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA / N. Galtier,
 D. Enard, Y. Radondy [et al.] // Genome Research. 2006. V. 16(2). P. 215-222.
- 63 Garcia-Sandoval, R. Why some clades have low bootstrap frequencies and high Bayesian posterior probabilities / R. Garcia-Sandoval // Israel Journal of Ecology & Evolution. – 2014. – V. 60(1). – P. 41-44.

- 64 Gearing, D. P. Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed in vitro and imported back into the organelle / D. P. Gearing, P. Nagley // The EMBO Journal. – 1986. – V. 5(13). – P. 3651-3655.
- 65 Gelder, S. R. Phylogenetic assessment of the Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using 18S rDNA, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I and morphological characters / S. R. Gelder, M. E. Siddall // Zoologica Scripta. – 2001. – V. 30. – P. 215-222.
- 66 Gelder, S. R. Global overview of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) /
 S. R. Gelder, B. W. Williams. Boca Raton : CRC Press, 2015. 679 p.
- 67 Gilkerson, R. The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis / R. Gilkerson, L. Bravo, I. Garcia [et al.] // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2013. – V. 5(5). – a011080.
- 68 Gobert, A. A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity / A. Gobert,
 B. Gutmann, A. Taschner [et al.] // Nature Structural & Molecular Biology. 2010.
 V. 17. P. 740-744.
- 69 Griffith, F. The Significance of Pneumococcal Types / F. Griffith // The Journal of Hygiene. – 1928. – V. 27(2). – P. 113-159.
- 70 Grube, A. E. Die Familien der Anneliden / A. E. Grube // Naturgeschichte. 1850. –
 V. 16. P. 249-361.
- 71 Gyllensten, U. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice / U. Gyllensten,
 D. Wharton, A. Josefsson [et al.] // Nature. 1991. V. 352. P. 255–257.
- 72 Habel, J. C. Relict species: Phylogeography and Conservation Biology / J. C. Habel,
 T. Assmann // Berlin: Springer-Verlag, 2010. 444 p.
- 73 Hasegawa, M. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA / M. Hasegawa, H. Kishino, T. Yano // Journal of Molecular Evolution. – 1985. – V. 22. – P. 160-174.
- 74 Hashimoto, Y. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ / Y. Hashimoto, T. Niikura, H. Tajima [et al.] // PNAS. 2001. V. 98(11). P. 6336-6341.

- 75 Hauck, A. K. New Host and Geographical Records for the Leech Acanthobdella peledina Grube 1851 (Hirudinea, Acanthobdellidae) / A. K. Hauck, M. J. Fallon, C. V. Burger // The Journal of Parasitology. 1979. V. 65(6). P. 989.
- 76 Hebert, P. Biological identifications through DNA barcodes / P. Hebert,
 A. Cywinska, S. L. Ball [et al.] // Proceedings of the Royal Society B. 2003. V. 270(1512). P. 313-321.
- 77 Hebert, P. From writing to reading the encyclopedia of life / P. Hebert, P. Hollingsworth, M. Hajibabaei // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2016. – V. 371. – 20150321.
- 78 Hillis, D. M. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis / D. M. Hillis, J. J. Bull // Systematic Biology. – 1993. – V. 42(2). – P. 182-192.
- 79 Hjort, K. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes / K. Hjort, A. V. Goldberg, A. D. Tsaousis [et al.] // Philosphical Translations of the Royal Society B. – 2010. – V. 365. – P. 713-727.
- 80 Hoarau, G. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus* / G. Hoarau, S. Holla, R. Lescasse, W. T. Stam, J. L. Olsen // Molecular Biology and Evolution. 2002. V. 19(12). P. 2261-2264.
- 81 Holder, M. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches / M. Holder,
 P. O. Lewis // Nature Reviews Genetics 2003. V. 4. P. 275-284.
- 82 Hollmer, M. Roche to close 454 Life Sciences as it reduces gene sequencing focus [Электронный ресурс] / М. Holmer // Fierce Biotech: сетевой журн. 2013. – Режим доступа: <u>https://fiercebiotech.com/medical-devices/roche-to-close-454-life-sciences-as-it-reduces-gene-sequencing-focus</u>
- 83 Holmquist, C. A fish leech of the genus *Acanthobdella* found in North America / C.
 Holmquist // Hydrobiologia. 1974. V. 44. P. 2-3.
- 84 Huang, Y. Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism /
 Y. Huang, S. Chen, Y. Chiang [et al.] // BMC Systems Biology. 2012. V. 6. –
 S10.

- 85 Illumina MiSeq System Guide [Электронный ресурс] Режим доступа: <u>https://support.illumina.com/content/dam/illumina-</u> <u>support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-</u> <u>guide-for-miseq-reporter-1000000061014-00.pdf</u>
- 86 Inkscape: Draw Freely. [Электронный ресурс] Режим доступа: <u>https://inkscape.org/ru/release/inkscape-1.1.1/</u>
- 87 Jansen, R. Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae / R. Jansen // Human Reproduction. 2000. V. 15. P. 112-128.
- 88 Jia, F. The impact of modeling rate heterogeneity among sites on phylogenetic estimates of intraspecific evolutionary rates and timescales / F. Jia, N. Lo, S. Y. W. Ho // PLOS One. 2014. V. 9(5). e95722.
- 89 Jukes, T. H. Evolution of protein molecules (Mammalian Protein Metabolism) / T. H. Jukes, Cantor C. R. New York : Academic Press, 1969. P. 21-132.
- 90 Kainer, D. The effects of partitioning on phylogenetic inference / D. Kainer,
 R. Lanfear // Molecular Biology and Evolution. 2015. V. 32(6). P. 1611-1627.
- 91 Kasha, M. Horizons in Biochemistry / M. Kasha, B. Pullman. New York : Academic Press, 1962. P. 189-225.
- 92 Katoh, K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability / K. Katoh, D. M. Standley // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – V. 30(4). – P. 772-780.
- 93 Kaygorodova, I. A. Molecular Phylogenetic Study of the Systematic Position of Baikalian Oligochaetes in Clitellata / I. A. Kaygorodova, D. Yu. Sherbakov // Russian Journal of Genetics. – 2006. – V. 42(12). – P. 1390-1397.
- 94 Kaygorodova, I. A. Leech-like parasites (Clitellata, Acanthobdellida) infecting native and endemic eastern siberian salmon fishes / I. A. Kaygorodova, E. V. Dzyuba, N. M. Pronin // The Scientific World Journal. 2012. V. 2012. P. 1-8.
- 95 Kaygorodova, I. A. New information on the distribution pattern of *Acanthobdella peledina* (Annelida, Acanthobdellida) in Eastern Siberia / I. A. Kaygorodova, E. V. Dzyuba // Zootaxa. 2018. V. 4399(1). P. 123-126.
- 96 Kaygorodova, I. Species delimitation through DNA barcoding of freshwater leeches of the Glossiphonia genus (Hirudinea: Glossiphoniidae) from Eastern Siberia, Russia / I. Kaygorodova, N. Bolbat, A. Bolbat // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2020. – V. 58. – P. 1437-1446.
- 97 Kchouk, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation / M. Kchouk, J. Gibrat, M. Elloumi // Biology and Medicine. – 2017. – V. 9(3). – 1000395.
- 98 Kimura, M. Evolutionary rate at the molecular level / M. Kimura // Nature. 1968.
 V. 217(5129). P. 624-626.
- 99 Kimura, M. A Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – Vol 16. – P. 111-120.
- 100 King, J. L. Non-Darwinian evolution / J. L. King, T. H. Jukes // Science. 1969. –
 V. 164(3881). P. 788-798.
- 101 Kondo, R. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila* / R. Kondo, Y. Satta, E. T. Matsuura [et al.] // Genetics. 1990. V. 126(3). P. 657-663.
- 102 Kowalevsky, A. Etude sur l'anatomie de l'*Acanthobdella peledina* / A. Kowalevsky
 // Bulletin de l'Academie Imperiale des Sciences de St.-Petersbourg. 1886. V. 4.
 P. 263-274.
- 103 Kowalevsky, A. Etude sur l'anatomie de l'Acanthobdella peledina et l'Archaeobdella esmontii / A. Kowalevsky // Bulletin de l'Academie Imperiale des Sciences de St.-Petersbourg. – 1886. – V. 1. – P. 1-4.
- 104 Kutschera, U. Nikolaj A. Livanow (1876 1974) and the living relict Acanthobdella peledina (Annelida, Clitellata) / U. Kutschera, V. M. Epshtein // Annals of the History and Philosophy of Biology. – 2006. – V. 11. – P. 85-98.

- 105 Kvist, L. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*) / L. Kvist, J. Martens, A. A. Nazarenko [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2003. V. 20(2). P. 243-247.
- 106 Lanfear, R. How do I set use PartitionFinder2 output to set up a BEAST analysis?
 (Partitionfinder FAQ) [Электронный ресурс] Режим доступа: <u>http://www.robertlanfear.com/partitionfinder/faq/#toc-beast</u>
- 107 Lanfear, R. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses / R. Lanfear, P. B. Frandsen, A. M. Wright [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2017. V. 34(3). P. 772-773.
- 108 Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L Salzberg // Nature Methods. – 2012. – V. 9. – P. 357-359.
- 109 Larget, B. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian Analysis of phylogenetic trees / B. Larget, D.L. Simon // Mol. Biol. EV. – 1999. – V. 16(6) – P. 750-760.
- 110 Laslett, D. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences / D. Laslett. B. Canback // Nucleic Acids Research. – 2004. – V. 32(1). – P. 11-16.
- 111 Lavrov, D. V. Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages. / D. V. Lavrov, W. Pett // Genome Biology and Evolution. 2016. V. 8(9). P. 2896-2913.
- 112 Leache, A. D. Short tree, long tree, right tree, wrong tree: new acquisition bias corrections for Inferring SNP phylogenies / A. D. Leache, B. L. Banbury, J. Felsenstein [et al.] // Systematic Biology. – 2015. – V. 64(6). – P. 1032-1047.
- 113 Lee, C. P. The discriminator base influences tRNA structure at the end of the acceptor stem and possibly its interaction with proteins. / C. P. Lee, N. Mandal, M. R. Dyson [et al.] // PNAS. 1993. V. 90. P. 7149-7152.
- 114 Levene, M. J. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations / M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner [et al.] // Science. 2003. V. 299(5607). P. 682-686.

- 115 Levinger, L. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease /
 L. Levinger, M. Mörl, C. Florentz // Nucleic Acid Research. 2004. V. 32(18). –
 P. 5430-5441.
- 116 Lewis, P. O. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data / P. O. Lewis // Systematic Biology. 2001. V. 50(6).
 P. 913-925.
- 117 Li, H. Higher-level phylogeny of paraneopteran insects inferred from mitochondrial genome sequences / H. Li, R. Shao, N. Song [et al.] // Scientific Reports. 2015. V. 5. 8527.
- 118 Lindmark, D. G. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism / D. G. Lindmark, M. Müller // Journal of Biological Chemistry. 1973. V. 248. P. 7724–7728.
- 119 Livanow, N. Acanthobdella peledina Grube, 1851 / N. Livanow // Zoologische Jarbücher. Anatomie. – 1906. – V. 22. – 636-866.
- 120 Livanow, N. Die organization der Hirudineen und diebeziehungen dieser gruppe zu den Oligochaeten / N. Livanow // Ergebn. Forrschr. Zool. – 1931. – V. 7. – 378-484.
- 121 Longer and longer: DNA sequence of more than two million bases now achieved with nanopore sequencing. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <u>https://nanoporetech.com/about-us/news/longer-and-longer-dna-sequence-more-</u> two-million-bases-now-achieved-nanopore
- 122 Luo, S. Biparental inheritance of mitochondrial dna in humans / S. Luo, C. A. Valencia, J. Zhang [et al.] // PNAS. 2018. V. 115(51). P. 13039-13044.
- 123 MacAlpine, D. M. Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA / D. M. MacAlpine, J. Kolesar, K. Okamoto, R. A. Butow, P. S. Perlman // The EMBO Journal. – 2001. – V. 20(7). – P. 1807-1817.
- 124 Magoulas, A. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engradis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA / A. Magoulas, E. Zouros // Molecular Biology and Evolution. – 1993. – V. 10(2). – P. 319-325.

- 125 Marquina, D. The effect of ethanol concentration on the morphological and molecular preservation of insects for biodiversity studies / D. Marquina, M. Buczek, F Ronquist [et al.] // PeerJ. – 2021. – V. 2021. – e10799.
- 126 Martijn, J. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria / J. Martijn, J. Vosseberg, L. Guy [et al.] // Nature. 2018. V. 557. P. 101-105.
- 127 Martin, P. Rapidly evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Annelida) / P. Martin, I. Kaygorodova, D. Sherbakov, E. Verheyen // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2000. V. 15(3). P. 355-368.
- 128 Martin, P. On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta / P. Martin // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2001. V. 268. P. 1089-1098.
- 129 Meaburna, E. Next generation sequencing in epigenetics: Insights and challenges / E. Meaburna, R. Schulz // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2012. V. 23(2). P. 192-199.
- 130 Michaelsen, W. Uber die beziehungen der Hirudineen zu den Oligochaeten / W. Michaelsen // Mitt. Zool. Mus. Hamburg. 1919. V. 36. P. 131-153.
- 131 Middendorff, A. T. Reise in den äußersten Norden und Osten Sibiriens /
 A. T. Middendorff. St. Petersburg, 1851. P. 1-24.
- 132 Milne, I. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data /
 I. Milne, G. Stephen, M. Bayer [et al.] // Briefings in Bioinformatics. 2013. V. 14(2). P. 193-202.
- 133 Mindell, D. P. An extra nucleotide is not translated in mitochondrial ND3 of some birds and turtles / D. P. Mindell, M. D. Sorenson, D. E. Dimcheff // Molecular Biology and Evolution. – 1998. – V. 15(11). – P. 1568-1571.
- 134 Minh, B. Q. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era / B. Q. Minh, H. A. Schmidt, O. Chernomor [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2020. – V. 37(5). – P. 1530-1534.
- 135 Moore, S. Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees, a reply to Hoelzer /
 S. Moore // Evolution. 1997. V. 51(2). P. 627-629.

- 136 Moran, R. J. A Guide to phylogenetic reconstruction using heterogeneous models a case study from the root of the placental mammal tree / R. J. Moran, C. C. Morgan, M. J. O'Connell // Computation. – 2015. – V. 3. – P. 177-196.
- 137 Morrison, D. How and where to look for tRNAs in Metazoan mitochondrial genomes, and what you might find when you get there [Электронный ресурс] / D. Morrison // bioRxiv. 2014. Режим доступа: <u>https://doi.org/10.1101/001875</u>
- 138 Munjal, G. Phylogenetics algorithms and applications / G. Munjal, M. Hanmandlu,
 S. Srivastava // Ambient Communications and Computer Systems. 2019. V. 904.
 P. 187-194.
- 139 Mutz, K. Transcriptome analysis using next-generation sequencing technology / K. Mutz, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, [et al.] // Current Opinion in Biotechnology. 2013. V. 24. P. 22-30.
- 140 Nabholz, B. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals / B. Nabholz, S. Glemin, N. Galiter // BMC Evolutionary Biology. – 2009. – V. 9. – 54.
- 141 New Chemistry Boosts Average Read Length to 10 kb 15 kb for PacBio® RS II [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <u>https://www.pacb.com/blog/newchemistry-boosts-average-read/</u>
- 142 Nurk, S. The complete sequence of a human genome [Электронный ресурс] / S.
 Nurk, S. Koren, A. Rhie // bioRxiv. 2021. Режим доступа: https://doi.org/10.1101/2021.05.26.445798
- 143 Oca-Cossio, J. Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells / J. Oca-Cossio, L. Kenyon, H. Hao [et al.] // Genetics. 2003. V. 165(2). P. 707-720.
- 144 Ojala, D. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA / D. Ojala, C. Merkel, R. Gelfand [et al.] // Cell. 1980. V. 22. P. 293-403.
- 145 Ojala, D. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria / D.
 Ojala, J. Montoya, G. Attardi // Nature. 1981. V. 290. P. 470-474.

- 146 Pagliarini, D. J. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology / D. J. Pagliarini, S. E. Calvo, B. Chang [et al.] // Cell. 2008. V. 134(1). P. 112-123.
- 147 Pattengale, N. D. How Many Bootstrap Replicates Are Necessary? / N. D. Pattengale, M. Alipour, O. Bininda-Emonds [et al.] // Journal of Computational Biology. 2010. V. 17(3). P. 337-354.
- 148 Peterson, K. J. Estimating metazoan divergence times with a molecular clock / K. J. Peterson, J. B. Lyons, K. S. Nowak [et al.] // PNAS. – 2004. – V. 101(17). – P. 6536-6541.
- 149 Philippe, H. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough / H. Philippe, H. Brinkmann, D. V. Lavrov [et al.] // PLOS Biology. – 2011. – V. 9(3). – e1000602.
- 150 Phillips, A. J. Phylogenomic analysis of a putative missing link sparks reinterpretation of leech evolution / A. J. Phillips, A. Dornburg, K. L. Zapfe [et al.] // Genome Biology and Evolution. – 2019. – V. 11(11). – P. 3082-3093.
- 151 Pons, J. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects / J. Pons, T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita [et al.] // Systematic Biology. – 2006. – V. 55(4). – P. 595-609.
- 152 Puigbò, P. TOPD/FMTS: a new software to compare phylogenetic trees / P. Puigbò,
 S. Garcia-Vallvé, J. O. McInerney // Bioinformatics. 2007. V. 23(12). P. 1556-1558.
- 153 Purschke, G. Morphological reinvestigation and phylogenetic relationship of *Acanthobdella peledina* (Annelida, Clitellata) / G. Purschke, W. Westheide, D. Rohde [et al.] // Zoomorphology. 1993. V. 113. P. 91-101.
- 154 Quicke, D. Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy / D. Quicke. St Edmunds : St Edmundsbury Press Ltd, 1996. – 311 p.
- 155 Rambaut, A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7 / A. Rambaut, A. J. Drummond, D. Xie [et al.] // Systematic Biology. 2018. V. 67(5). P. 901-904.

- 156 Reichert, A. Processing and editing of overlapping tRNAs in human mitochondria / A. Reichert, U. Rothbauer, M. Mörl // The Journal Of Biological Chemistry. 1998. V. 273(48). P. 31977-31984.
- 157 Reichert, A. Repair of tRNAs in metazoan mitochondria / A. Reichert, M. Mörl // Nucleic Acids Research. – 2000. – V. 28(10). – P. 2043-4048.
- 158 Rokas, A. Animal mitochondrial DNA recombination revisited / A. Rokas,
 E. Ladoukakis, E. Zouros // Trends in Ecology and Evolution. 2003. V. 18(8). –
 P. 411-417.
- 159 Ronaghi, M. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release / M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson [et al.] // Analytical Biochemistry. 1996. V. 242. P. 84-89.
- 160 Rouse, G. The Annelida and their close relatives / G. Rouse. Oxford : University Press, 1998 – P. 179–183.
- 161 Rousset, V. Evolution of habitat preference in Clitellata (Annelida) / V. Rousset, L. Plaisance, C. Erséus [et al.] // Biological Journal of the Linnean Society. 2008. V. 95. P. 447-464.
- 162 Rubinoff, D. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference / D. Rubinoff, B. Holland // Systematic Biology. – 2005. – V.54(6). – P. 952-961.
- 163 Rusk, N. Torrents of sequence / N. Rusk // Nature Methods. 2011. V. 8(1). P. 44-44.
- 164 Saccone, C. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system / C. Saccone, C. De Giorgi, C. Gissi [et al.] // Gene. – 1999. – V. 238. – P. 195-209.
- 165 Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. – 1987. – V. 4(4). – P. 406–425.
- 166 Salunkhe, R. C. Distribution and evolutionary impact of *Wolbachia* on butterfly hosts / R. C. Salunkhe, K. P. Narkhede, Y. S. Shouche // Indian Journal of Microbiology. – 2014. – V. 54(3). – P. 249-254.

- 167 Satoh, H. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell / M. Satoh, T. Kuroiwa // Experimental Cell Research. – 1991. – V. 196. – P. 137-140.
- 168 Sawyer, R. T. Leech Biology and Behavior / R. T. Sawyer. Oxford : Clarendon Press, 1986. – 793 p.
- 169 Seemann, T. barrnap 0.9: rapid ribosomal RNA prediction [Электронный ресурс] // GitHub. Режим доступа: <u>https://github.com/tseemann/barrnap</u>
- 170 Segata, N. Computational meta'omics for microbial community studies / N. Segata,
 D. Boernigen, T. L. Tickle [et al.] // Molecular Systems Biology. 2013. V. 9. P. 666.
- 171 Siddall, M. E. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I / M. E. Siddall, E. M. Burreson // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 1998. – V. 9(1). – P. 156-162.
- 172 Siddall, M. E. Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes / M. E. Siddall, K. Apakupakul, E. M. Burreson [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2001. – V. 21(3). – P. 346-351.
- 173 Sievers, F. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega / F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen [et al.] // Molecular Systems Biology. 2011. V. 7. 539.
- 174 Simmons, M. P. How Can Third Codon Positions Outperform First and Second Codon Positions in Phylogenetic Inference? An Empirical Example from the Seed Plants / M. P. Simmons, L. Zhang, C. T. Webb [et al.] // Systematic Biology. 2006. V. 55(2). P. 245-258.
- 175 Šmid, O. Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *Trichomonas vaginalis* and Giardia intestinalis / O. Šmíd, A. Matušková, S. R. Harris [et al.] // PloS Pathogens. 2008. V. 4. e1000243.
- 176 Smith, D. R. Mitochondrial and plastid genome architecture: Reoccurring themes, but significant differences at the extremes / D. R. Smith, P. J. Keeling // PNAS. – 2015. – V. 112(38). – P. 10177-10184.

- 177 Sokal, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationships / R. R. Sokal, C. D. Michiner // University of Kansas science bulletin. 1958. V. 38(2). P. 1409-1438.
- 178 Sullivan, J. Combining data with different distributions of among-site rate variation
 / J. Sullivan // Systematic Biology. 1996. V. 45(3). P. 375-380.
- 179 Suzuki, Y. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics // Y. Suzuki, G. V. Glazko, M. Nei // PNAS. 2002. V. 99(25). P. 16138-16143.
- 180 Swire, J. Mitochondrial genetic codes evolve to match amino acid requirements of proteins / J. Swire, O. P. Judson, A. Burt // Journal of Molecular Evolution. 2005.
 V. 60 P. 128-139.
- 181 Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei / Molecular Biology and Evolution. – 1993. – V. 10(3). – P. 512-526.
- 182 Tan, G. Current methods for automated filtering of multiple sequence alignments frequently worsen single-gene phylogenetic inference / G. Tan., M. Muffato, C. Ledergerber [et al.] // Systematic Biology. – 2015. – V. 64(5). – P. 778-791.
- 183 Tavaré, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences / S. Tavaré // Lectures on Mathematics in the Life Sciences. – 1986. – V. 17. – P. 57-86.
- 184 Tessler, M. Worms that suck: phylogenetic analysis of Hirudinea solidifies the position of Acanthobdellida and necessitates the dissolution of Rhynchobdellida / M. Tessler, D. de Carle, M. L. Voiklis [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2018. V. 127. P. 129-134.
- 185 Trontelj, P. Molecular phylogeny of leeches: Congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking / P. Trontelj, B. Sket, G. Steinbrük // J. Zool. Syst. EV. Research. – 1999. – V. 37. – P. 141-147.
- 186 Udea, M. Presence of a latent mitochondrial targeting signal in gene on mitochondrial genome / M. Ueda, M. Fujimoto, S. Arimura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2008. – V. 25(9). – P. 1791-1793.

- 187 Utevsky, S. Y. New records of the chaetiferous leech-like annelid *Paracanthobdella livanowi* (Epshtein, 1966) (Annelida: Clitellata: Acanthobdellida) from Kamchatka, Russia / S. Y. Utevsky. S. G. Sokolov, M. B. Shedko // Systematic Parasitology. 2013. V. 84. P. 71-79.
- 188 Uzzel, T. Fitting discrete probability distributions to evolutionary events / T. Uzzel,
 K. W. Corbin // Science. 1971. V. 172(3988). 1089-1096.
- 189 Varongchayakul, N. Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial / N. Varongchayakul, J. Song, A. Meller [et al.] // Chemical Society Reviews. 2018. V. 47(23). P. 8512-8524.
- 190 Vinther, J. Machaeridians are Palaeozoic armoured annelids / J. Vinther, P. Van Roy,
 D. E. G. Briggs // Nature. 2008. V. 451(7175). P. 185-188.
- 191 White, D. J. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance / D. J. White,
 J. N. Wolff, M. Pierson, N. J. Gemmell // Molecular Ecology. 2008. V. 17(23). –
 4925-4942.
- 192 Williams, B. W. Molecular phylogeny of North American Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) / B. W. Williams, S. R. Gelder, H. C. Proctor [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2013. V. 66. P. 30-42.
- 193 Wu, C. Bayesian selection of nucleotide substitution models and their site assignments / C. Wu, M. A. Suchard, A. J. Drummond // Molecular Biology and Evolution. – 2012. – V. 30(3). – P. 669-688.
- 194 Xia, X. An index of substitution saturation and its application / X. Xia, Z. Xie, M. Salemi [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003. V. 23. P. 1-7.
- 195 Xu, J. The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms /
 J. Xu // Genome. 2005. V. 48. P. 951-958.
- 196 Yang, Z. Estimation of the transition/transversion rate bias and species sampling / Z. Yang, A. D. Yoder // Journal of Molecular Evolution. 1999. V. 48. P. 274-283.
- 197Yang, Z. Molecular phylogenetics: principles and practice / Z. Yang, B. Rannala // Nature Reviews. 2012. V. 13. P. 303-314.

- 198 Yokobori, S. Transfer RNA editing in land snail mitochondria / S. Yokobori, S. Pääbo // PNAS. 1995. V. 92(22). P. 10432-10435.
- 199 Zardoya, R. Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles / R. Zardoya, A. Meyer // PNAS. – 1998. – V. 95. – P. 14226-14231.
- 200 Zhao, X. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*) / X. Zhao, N. Li, W. Guo [et al.] // Heredity. 2004. V. 93. P. 399-403.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунки

1	Внешняя морфология A. peledidna (1, 2) и P. livanowi (3, 4) по Эпштейну [10] 17
2	Внешняя морфология <i>A. peledidna</i> (1 – организм целиком, 2 – головная лопасть) по Phillips et al. [150] и <i>P. livanowi</i> (3 – организм целиком, 4 – головная лопасть) по Utevsky et al. [187]
3	Ареал обитания акантобделлид в палеарктической области с указанием исторических точек сбора [3, 5, 7, 8, 10, 11, 94, 187]. Красным отмечен ареал <i>A. peledina</i> , синим – <i>P. livanowi</i>
4	Схематизированные кладограммы кольчатых червей, полученные на основе морфологических (выделено серым фоном) и молекулярных данных. Ссылки на работы приведены под каждой схемой. Обозначения таксонов: О – Oligochaeta, В – Branchiobdellida, А – Acanthobdellida, Н – Hirudinea
5	Зависимость статистических показателей результатов геномной сборки от количества необработанных прочтений. Статистические показатели нормализованы от 0 до 1
6	Значения доли гуанина и цитозина в митохондриальных геномах кольчатых червей (Annelida). Усы показывают крайние значения доли ГЦ-оснований не далее 1,5 межквартильных интервалов
7	Общая схема митохондриального генома представителей <i>А. peledina</i> . Жёлтым цветом обозначены белок-кодирующие гены, голубым – гены тРНК, красным – гены рРНК, серым – контрольный регион и регион псевдогенных тандемных повторов
8	тРНК-подобные структуры на комплементарной цепи митохондриальной ДНК <i>A. peledina</i> , аннотированные программой Aragorn [110]
9	Общая схема митохондриального генома представителей <i>P. livanowi</i> . Жёлтым цветом обозначены белок-кодирующие гены, голубым – гены тРНК, красным – гены рРНК, серым – контрольный регион
10	тРНК-подобные структуры на комплементарной цепи митохондриальной ДНК 80 <i>P. livaowi</i> , аннотированные программой Aragorn [110]
11	Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные из ML-деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов <i>cox1</i> : слева – несегментированные данные, справа – сегментированные данные. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки
12	Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные из ВІ-деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов <i>cox1</i> : слева – несегментированные данные, справа – сегментированные данные. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки
13	Упрощенные схемы кластеризации ключевых групп кольчатых червей, выведенные из филогенетических деревьев, полученных на основе сравнения фрагментов <i>12S</i> : слева – несегментированные данные (BI), справа – сегментированные данные (BI), снизу – общая схема ML-деревьев. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF –

водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки 85 Упрощенная схема кластеризации ключевых групп кольчатых 14 червей. выведенные из филогенетических деревьев, полученных на основе сравнения полных митогенов. Обозначение таксонов: А – акантобделлиды, Р – полихеты, OS – почвенные олигохеты, OF – водные олигохеты, HR – хоботные пиявки, HA – бесхоботные пиявки 88 бутстреп-поддержек 15 Распределения значений (слева) и байесовских апостериорных поддержек (справа) в зависимости от используемого генного фрагмента и способа его обработки. Значения бутстреп масштабированы от 0 до 1 91 Тепловая карта узловых дистанций между топологиями филогенетических 16 деревьев. Кладограммы на схеме отражают результаты кластерного анализа сходства топологий 92 Зависимость длины древа (суммы длин всех ветвей) от метода реконструкции и 17 сегментации данных 93 Таблицы 1 Морфологические отличия видов акантобделлид 20 2 Краткая характеристика моделей молекулярной эволюции 48 3 Сравнение филогенетических методов 52 4 Места сбора и условные обозначения исследуемых образцов 59 5 Условия амплификации маркерных генов 61 6 Условия амплификации маркерных генов 66 7 Количество данных, полученных в результате обработки публичных данных 68 8 Статистические характеристики результатов геномной сборки 69 9 Длина митохондриальных геномов исследуемых образцов 71 Соответствие реконструированных филогенетических деревьев различным 10 гипотезам об эволюции аннелид 94

Вид	Класс Подкласс Отряд		Семейство	Длина сиквенса, п.н.	Номер в GenBank	Автор, дата					
Amynthas_aspergillus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15115	KJ830749	Zhang, 2014				
Amynthas_carnosus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15160	KT429008	Zhang, 2015				
Amynthas_corticis	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15126	KM199290	Zhang, 2014				
Amynthas_cucullatus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15122	KT429012	Zhang, 2015				
Amynthas_gracilis	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15161	KP688582	Zhang, 2015				
Amynthas_hupeiensis	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15069	KT429009	Zhang, 2015				
Amynthas_jiriensis	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15151	KT783537	Hong et al., 2016				
Amynthas_longisiphonus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15176	KM199289	Zhang, 2015				
Amynthas_moniliatus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15133	KT429020	Zhang, 2016				
Amynthas_morrisi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15026	KT429011	Zhang, 2016				
Amynthas_pectiniferus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15188	KT429018	Zhang, 2016				
Amynthas_robustus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15013	KT429019	Zhang, 2016				
Amynthas_sp	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15159	KT429007	Zhang, 2016				
Amynthas_sp	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15131	KT429010	Zhang, 2016				
Amynthas_sp	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15152	KT429013	Zhang, 2016				
Amynthas_sp	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15086	KT429014	Zhang, 2016				
Amynthas_triastriatus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15160	KT429016	Zhang, 2016				
Drawida_gisti	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	14648	MN539609	Liu et al., 2021				
Drawida_japonica	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	14648	KM199288	Zhang, 2015				
Duplodicodrilus_schmardae	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15156	KT429015	Zhang, 2016				
Metaphire_californica	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15147	KP688581	Zhang, 2015				
Metaphire_hilgendorfi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15186	LC573968	Matsuda et al., 2020				
Metaphire_guillelmi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15174	KT429017	Zhang, 2016				
Metaphire_vulgaris	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15061	KJ137279	Zhang & Jiang, 2014				
Perionyx_excavatus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15083	EF494507	Kim et al., 2016				
Tonoscolex_birmanicus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae	15170	KF425518	Wang et al., 2013				
Aporrectodea_rosea	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	15086	MK573632	Shekhovtsov & Peltek, 2020				

Список видов группы сравнения с краткой характеристикой их митогеномов

Приложение 1. Список видов группы сравнения с краткой характеристикой их митогеномов (продолжение)

Fisenia balatonica	Clitellata	Oligochaeta	Onisthonora	Lumbricidae	14589	MK 642872	Shekhovtsov et al. 2019
Eisenia papa	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14572	MK618511	Shekhovtsov et al. 2019
Eisenia_nana Eisenia_nordenskieldi	Clitallata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14572	MK618500	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opistilopora		14572	MIK018509	Shekhovisov et al., 2019
Elsenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opistnopora	Lumbricidae	14592	MK618510	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14567	MK618512	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14567	MK618513	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14576	MK642867	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_nordenskioldi	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14556	MK642868	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_spelaea	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14738	MK642870	Shekhovtsov et al., 2019
Eisenia_tracta	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14589	MK642871	Shekhovtsov et al., 2019
Lumbricus_rubellus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	15464	MN102127	Liu et al., 2019
Lumbricus_terrestris	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	14998	U24570	Boore & Brown, 1995
Pontoscolex_corethrurus	Clitellata	Oligochaeta	Opisthopora	Glossiscolecidae	14835	KT988053	Cunha et al., 2017
Nais_communis	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	15685	MW770354	Lee, 2021
Olavius_algarvensis	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	15730	LR992058	Sato, 2021
Olavius_algarvensis	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	15715	LR992059	Sato, 2021
Tubifex_tubifex	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	15972	MW690579	Lee & Jung, 2021
Tubifex_tubifex	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	15713	MT266931	Lee & Jung, 2020
Limnodrilus_hoffmeisteri	Clitellata	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	14960	MW732144	Lee & Jung, 2021
Glossiphonia_concolor	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	14548	MT628565	Leerhoei, 2020
Haementeria_acuecueyetzin	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	14985	MT683771	Sosa-Jimenez, 2020
Haementeria_officinalis	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	14849	LT159848	Manzano-Marin, 2016
Placobdella_lamothei	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	15190	LT159849	Manzano-Marin, 2016
Placobdella_parasitica	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	14909	LT159850	Manzano-Marin, 2016
Zeylanicobdella_arugamensis	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Piscicolidae	16161	KY474378	Wang et al., 2017
Ozobranchus_jantseanus	Clitellata	Hirudinea	Rhynchobdellida	Ozobranchidae	14864	KY861060	Liu & Zhang, 2017
Erpobdellidae_sp	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Erpobdellidae	14746	MT671489	Macher et al., 2020
Erpobdella_japonica	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Erpobdellidae	14725	MF358688	Guan, 2017
Erpobdella_octoculata	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Erpobdellidae	14407	KC688270	Nie & Xu, 2014
Erpobdella_testacea	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Erpobdellidae	14495	MT584166	Leerhoei, 2020
Erpobdella_sp	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Erpobdellidae	15469	MW435182	Park et al., 2021

Haemadipsa_crenata	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemadipsidae	14725	MW711186	Meng & Liu, 2021
Whitmania_acranulata	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	13494	KM655838	Ye & You, 2015
Whitmania_acranulata	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	14462	KC688271	Nie & Xu, 2014
Whitmania_acranulata	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	14468	MK347500	Pan, 2020
Whitmania_laevis	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	14433	KC688269	Nie & Xu, 2014
Whitmania_laevis	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	14442	KM655839	Ye & You, 2015
Whitmania_pigra	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Haemopidae	14426	EU304459	Wu et al., 2016
Hirudinaria_manillensis	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Hirudinidae	14470	KC688268	Nie & Xu, 2014
Hirudo_medicinalis	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Hirudinidae	14729	KU672396	Nikitina et al., 2016
Hirudo_nipponia	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Hirudinidae	14414	KC667144	Nie & Xu, 2014
Hirudo_verbana	Clitellata	Hirudinea	Arhynchobdellida	Hirudinidae	14604	KU672397	Nikitina et al., 2016
Alitta_succinea	Polychaeta	Errantia	Phyllodocida	Nereididae	15409	MN812981	Alves et al., 2020
Glycera_americana	Polychaeta	Errantia	Phyllodocida	Glyceridae	15571	KT989321	Richter et al., 2015
Clymenella_torquata	Polychaeta	Sedentaria	Scolecida	Maldanidae	15538	AY741661	Jennings & Halanych, 2016
Galathealinum_brachiosum	Polychaeta	Sedentaria	Sabellida	Siboglinidae	14779	KJ789162	Li et al., 2015
Manayunkia_occidentalis	Polychaeta	Sedentaria	Sabellida	Fabriciidae	15103	MT662116	Tilic et al., 2020
Marenzelleria_neglecta	Polychaeta	Sedentaria	Spionida	Spionidae	15339	MK120303	Gastineau, 2019
Pista_cristata	Polychaeta	Sedentaria	Terebellida	Terebellidae	15894	EU239688	Zhong et al., 2016
Urechis_caupo	Polychaeta	Echiura	Xenopneusta	Urechidae	15113	AY619711	Boore, 2016

Приложение 1. Список видов группы сравнения с краткой характеристикой их митогеномов (продолжение)

Приложение 2.

Порядок генов митохондриальных геномов у разных родов кольчатых червей (Annelida)

													1					1																
Polychaeta				_			_															_		_			_		_	_				
Urechis	cox1 cox	2 Pro	Asp	atp8 T	hr nd	141 no	d4 Met	Asn	Gly	nd2	Туг	Leu	Ala	Ser	Leu	nd1	lle	Lys	nd3	12S	165 V	al S	ier (ox3 G	iln n	d6 cy	tb Trp	at	<mark>p6</mark> Arg	His	nd5	Phe	Cys	Glu
Marenzelleria	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 1	iyr Gl	y G	in Trp	Ser	Arg	cox3	nd6	cytb	atp€	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4 C	ys 🖌	Ala I	Vet 1	2S Va	al 16	iS Le	u Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Alitta	cox1 Asr	1 cox2	Gly	Tyr a	atp8 M	et A	sp cox	GIn	nd6	cytb	Тгр	atpe	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	x 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Se	r <mark>Ala</mark>	Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Glycera	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	yr co	xE G	in nd6	cytb	Trp	atpe	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys	Gly N	let 1	12S	/al 1	6S Le	u Se	r Ala	Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Manayunkia	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	yr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Ser	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4 C	ys N	/let	12S 1	6S Va	al Le	u Ala	no	i1 lle	Lys	nd3	Ser	nd2	
Pista	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	yr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	atpe	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys	Met N	let 1	12S	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Clymenella	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	Lys	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4 C	ys N	/let	l2S V	al 10	5S Le	u Ala	s Se	ir Leu	nd1	lle	nd3	Ser	nd2
Galathealinum	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Oligochaeta (почвенные)																																		
Все рода	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Oligochaeta (пре	есново	дны	e)																															
Nais	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	His	nd5	Glu	Pro	nd4l	nd4	Phe	Thr	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Olavius	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	Тгр	atpE	nd3	nd6	Ala	Leu	nd1	lle	Ser	cytb	His	nd5	Phe	Lys A	rg 🤇	ilu I	ro T	hr n	d4l no	i4 Cy	s M	et 12S	Val	16S	Leu	nd2	
Tubifex	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Limnodrilus	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Lumbriculus	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 <mark>0</mark>	aly co	x3 Tr	rp atp	E cytb	Trp	His	GIn	Туг	nd6	Tyr	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4 C	ys N	Met 1	12S V	al 10	5S Le	u Ala	s Se	ir Leu	nd1	lle	Lys	nd3	Ser nd2
Acanthobdellida																																		
Acanthodella	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Paracanthobdella	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	fyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Hirudinea																																		
Glossiphonia	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	۱2S ۱	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Baicaloclepsis	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Theromyzon	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Trp	atpE	His	Arg	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	Ser nd2
Piscicola	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Codonobdella	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Erpobdella	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 T	iyr Gl	y co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Erpobdella*	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 0	Sly Ty	r co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Se	r Ala	Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Haemopis	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 0	Sly Ty	r co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpE	х	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Whitmania	cox1 Asr	n cox2	Asp	atp8 0	Sly Ty	r co	ox3 GIn	nd6	cytb	Тгр	atpe	Arg	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Cys N	let 1	12S \	/al 1	6S Le	u Al	a Sei	r Le	u nd1	lle	Lys	nd3	Ser	nd2
Haemadipsa	cox1 Asr	1 cox2	Asp	atp8 0	aly Ty	r co	ox3 GIn	nd6	cytb	Arg	Тгр	atp€	His	nd5	Phe	Glu	Pro	Thr	nd4l	nd4	Met 1	2S \	/al 1	les <mark>l</mark>	eu A	a Se	er Lee	n	i1 Lys	lle	nd3	Cys	Ser	nd2

*Erpobdella_octoculata_KC688270.

бутстреп nthas_aspergillus etaphire_californic _KJ830749 a KP688581 поддержки (T429019 (T429016 Am 25 27 429009 An atus_KT429020 KM199290 32 39 73968 18 40 41 43 nus_KM199289 46 KT429015 57 518 ti_MN539609 Drawida gi - Drawida 59 Pontoscolex_co Eisenia_sp umbricus_rubel 61 Lumb 62 terrest 63 E 64 65 67 Fisenia Nais co MW6905 tubifex_ 74 0 tubifex Limnodrilus_hoffmeisteri T Lumbriculus_variegatus_OM062609 76 Olavius_algarvensis_LR9 Olavius_algarvensis_LR9 Acanthobdella_pe Acanthobdella_pe Acanthobdella_p Acanthobdella_p Acanthobdella_p 77 ****** 78 79 81 Paracanthobdella lia livanowi OM117614 lia livanowi OM117615 688270 -5 83 Erpobdella octoculata manillensis pigra_EU304 84 idinaria 688268 Hirudinaria_manillensis KC688268 Hirudo_nipponia_KC667144 Whitmania_acranulata_KC688271 Whitmania_acranulata_KC688271 Whitmania_aevis KC688269 Whitmania_aevis KC6855839 Hirudo verbana KU672397 Haemopis sanguisuga OM234779 Haemopis sanguisuga OM234779 Haemopis sanguisuga OM234778 Haemopis sanguisuga OM237165 Theromyzon tessulatum OM039423 Haementeria acticueyetzin MT683771 Haementeria acticueyetzin MT6837165 Haemopisess Baitabase Hittopisess Hitt tmania_pigra Hirudo_nippo 85 86 87 90 93 * 94 95 96 97 ** 98 99 100 ****

Рисунок 18. Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного

фрагмента *cox1*.

Приложение 3.

Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

0.2

Приложение 4.



фрагмента *cox1*.



Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

Приложение 5.

Рисунок 20. Байесовское древо на основе несегментированного фрагмента *cox1*. Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

Приложение 6.

Рисунок 21. Байесовское древо на основе сегментированного фрагмента *cox1*. Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



Приложение 7.

Рисунок 22. Байесовское древо на основе несегментированного фрагмента 12S.

Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



Приложение 8.

Рисунок 23. Байесовское древо на основе сегментированного фрагмента 12S.

Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



_aspergillus_KJ83 _californica_KP6 robustus_KT429 бутстреп поддержки 429019 KT429016 41 44 88582 50 51 60 62 KT429018 64 99290 65 , nus_KM199289 66 429012 29 KT429015 ardae K142 KF425518 67 69 MN539609 hica_KM199288 <u>د</u> 70 A<u>po</u>rrectodea 71 76 78 80 Pontoscolex_corethrurus_KT988053 Lumbriculus_variegatus_OM062609 81 Olavius algarvensis 83 Olavius algarvensis L99 Erpobdella octoculata KC688 Whitmania_pigra_EU304459 Whitmania_acranulata KC688 Whitmania_acranulata KC68 Whitmania_laevis_KC688269 Hirudo_nipponia_KC667144 Whitmania_acranulata • 84 , 347500 988271 87 88 irudo_nipponia itmania acrani 89 Haemopis_sanguisuga Haemopis_sanguisuga Hirudinaria_manillens 0 90 Hirudinaria_mi Hirudo_medicinalis K Hirudo_verbana_KU67 Erpobdellidae_sp_Mt435182 Erpobdella_testacea_MT584166 Erpobdella_japonica_MF358688 Glossiphonia_concolor_SRX90092 Glossiphonia_concolor_SRX90092 alcaloclepsi5_echinulate Theromy KC688268 91 Hirudo_medicinalis_KU672 Hirudo_verbana_KU672393 93 Haemadipsa_crenata_MW711186 94 95 * * 96 97 **** 98 Haementeria Placobdella T 99 100 Placobdella_Tamot Placobdella_parasiti * Ozobranchus jantseanus KY86106 Acanthobdella peledina Acanthobdella peledina Acanthobdella peledina ****** anthobdella beledina aracanthobdella_livanowi_OM117614 Paracanthobdella_livanowi_OM117615 -¢ ex_MW ex_tubi Tubifex UNVER Limnodrilus_ Limnodrilus_hoffmeister_MV732144 Clymenella torguata_AY741661 Pista_cristata_EU239688 Urechis_caupo_AY619711 Marenzelleria_neglecta_MK120303 Galathealinum_brachiosum_K1789162 Mangunkia_occidentalis_MT662116 Alitta_succinea_MN812981 Glycera_americana_KT989321 fex_MT266931 MW732144

Рисунок 24. Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного

фрагмента 12S.

Приложение 9.

Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

0.4

бутстреп поддержки ca K 42 **KT429016** 45 28582 46 49 52 T429018 , 99290 56 us_KM199289 57 429012 --- KT429015 425518 Perion 60 / 39609 __KM199288 32 6 65 Aporrecto 71 74 75 77 78 orethrurus KT988053 gatus OM062609 82 1930053 2609 ○lavius_algarvensis_LR992058 ○lavius_algarvensis_LR992059 Erpobdella_octoculata_KC688270 Whitmania_pigra_E1304459 Whitmania_acranulata_KC688271 Whitmania_laevis_KC688269 Hirudo_nipponia_KC667144 Whitmania_acranulata_KK655338 Hirudo_reptoina KU672397 Haemopis_sanguisuga_OM234779 Haemopis_sanguisuga_OM234778 Hirudonaria_manillensis_KC688268 Lumbriculus vari 83 84 85 86 88 90 ** 91 92 Erpobdellidae sp. MT671489 Erpobdella_testacea_MT584166 Erpobdella_testacea_MT584166 Erpobdella_taponica_MT5356688 complanata_OM039422 __concolor_MT628565 __concolor_SRX9009202 Haemadipsa_crenata_MW711186 93 ÷ 94 * 95 * 96 *** ь 57165 zin_MT683771 459848 97 _acu offic 98 99 Pla Theromyzon tessulatum *** Sulatum Umosa425 Codonobdella sp M2202177 Piscicola_geometra_BK059172 - Zeylanicobdella_arugamensis_KY474378 100 -0 -- Zeylanic chus_jantseanus Acanthobdella_p Acanthobdella_p Acanthobdella_p Y861060 Ozobranchus ****** -0 obdella_livanowi_OM117614 ubifex_tubifex UNVER_Tubifex MW690579 tubifex MT266931 isteri MW732144 UNVER_Tubifex_tubifex_MT266931 Limnodrilus_hoffmeisteri_MW732144 Orgenenila_torguata_AY741661 Pista_cristata_EU239688 Urechis_caupo_AY619711 Galathealinum_brachiosum_KJ789162 Marenzelleria_neglecta_MK120303 Alitta_succinea_MN812981 Glycera_americana_KT989321 ۵

Рисунок 25. Максимально правдоподобное древо на основе сегментированного

фрагмента 12S.

Приложение 10.

Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный - класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

0.6

Приложение 11.

Рисунок 26. Байесовское древо на основе несегментированного набора последовательностей полных митогеномов. Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



Приложение 12.

Рисунок 27. Байесовское древо на основе сегментированного набора последовательностей полных митогеномов. Красной линией отмечен порог внутривидовой вариабельности по GMYC.



Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.

бутстреп _aspergillus_KJ830749 _californica_KP688581 robustus_KT4<u>2</u>9019 mvnthas поддержки 429016 82 55 57 T429009 64 783537 LC573968 65 3 T429008 (T429012 99290 67 68 69 14 onus_KM199289 ardae_KT429015 '429020 KT429018 429017 77 25518 83 86 MK618509 K642867 87 MK642868 MK618512 88 K618510 K618513 91 94 95 КТ988053 96 **19288** 97 Ċ T266931 MW732144 98 ais_com Lumbricu 99 Canthobdella peledina MZ562 Acanthobdella peledina OM117 Acanthobdella peledina OM2031 Acanthobdella peledina OM2031 Acanthobdella peledina OM2031 Acanthobdella livanowi OM1 Paracanthobdella agn Z20217 Piscicola geometra BK05917 Coloranchus jantseanus KY861060 Glossiphonia complanata OM039422 Glossiphonia concolor MT628565 Glossiphonia concolor SRX9009202 Baicaloclepsis grubei OM257165 Beicaloclepsis echinulata OM257165 Beicaloclepsis concurrentata OM257165 Baicaloclepsis concurrentata OM257165 Baicaloclepsis della MT68377 Haementeria acuecata Internetata 0M062609 varie ******* 100 <figure><text> edina_OM214536 livanowi_OM117614 livanowi_OM117615 a_sp_MZ202177 netra_BK059172

Рисунок 28. Максимально правдоподобное древо на основе несегментированного набора последовательностей полных митогеномов.

Приложение 13.

Приложение 14.

Рисунок 29. Максимально правдоподобное древо на основе сегментированного набора последовательностей полных митогеномов.



Примечание. Ярлыки образцов на древе окрашены в соответствии с таксономической или экологической принадлежностью: красный – отряд Acanthobdellida, зелёный – отряд Rhynchobdellida, синий – отряд Arhynchobdellida, голубой – водные олигохеты, коричневый – почвенные олигохеты, чёрный – класс Polychaeta. Звёздочками (*) отмечены образцы, митохондриальные геномы которых были собраны в данной работе.