

На правах рукописи

Лопаткин Антон Александрович

**Изучение особенностей молекулярной эволюции птичьих шистосом
(Trematoda: Schistosomatidae)**

Специальность 03.01.07 – молекулярная генетика

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории организации генома Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Рысков Алексей Петрович

кандидат биологических наук

Семенова Серафима Константиновна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Евгеньев Михаил Борисович

кандидат биологических наук

Потапов Сергей Георгиевич

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Защита состоится «23» мая 2011 г. в 11-00 час. на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334 Москва, ул. Вавилова, д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991 Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан «22» апреля 2011 года.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук

Грабовская Л. С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эволюционные преобразования макромолекулярных структур клеток, таких как нуклеиновые кислоты и белки, составляют одну из актуальных проблем современной молекулярной генетики. Последние достижения в области геномики и биоинформатики привели к резкому увеличению числа фундаментальных исследований, направленных на выяснение механизмов молекулярной эволюции и реконструкцию эволюционной истории генов у организмов различного таксономического ранга. Ядерные и митохондриальные ДНК широко используются для выявления родственных взаимосвязей между отдельными особями или группами особей, для изучения динамики генетических процессов в популяциях, описания структуры вида и истории его возникновения [Avice, 2003].

С этой точки зрения особый интерес представляют сложные биологические системы, состоящие из двух или нескольких коэволюционирующих организмов, например паразитов и их хозяев. Среди паразитических организмов одну из наиболее многочисленных групп составляют плоские черви – трематоды, или сосальщики (Platyhelminthes: Trematoda), объединяющие более 18000 видов паразитов беспозвоночных и позвоночных животных. Трематоды отличаются от остальных эукариот наличием сложного жизненного цикла, связанного со сменой животных-хозяев и чередованием нескольких последовательных партеногенетических и одного гермафродитного поколения. Все трематоды – эндопаразиты, обитающие во взрослом состоянии во внутренних органах позвоночных животных и человека, которые являются их дефинитивными (окончательными) хозяевами, а роль первого промежуточного хозяина всегда выполняют различные виды моллюсков [Скрябин, 1948; Гинецинская 1968; Gibson et al., 2002]. Общебиологический интерес представляют проблемы систематики и филогении трематод, процессы взаимодействия паразита с окружающей средой, в качестве которой выступает не только комплекс природных абиотических факторов, но, в первую очередь, сам организм животного-хозяина. Молекулярно-генетические исследования являются весьма перспективными для выяснения механизмов адаптаций, возникающих при разных способах размножения и смены животных-хозяев.

Различные факторы влияют на эволюционную динамику нуклеотидных изменений ядерного и митохондриального генома, и это отражается на уровне отдельных особей, популяций и видов в процессе филогенеза [Ballard, 2000]. К их числу можно отнести различия в скоростях геномной репликации и репарации, смещения в соотношении

нуклеотидных замен, различную скорость возникновения внутривидовой гетерогенности за счет неполной сортировки геномов и адаптивную эволюцию.

Помимо фундаментального значения исследование молекулярной филогении трематод может иметь практическое приложение в медицине и сельском хозяйстве при разработке методов генотипирования возбудителей заболеваний человека и животных, а также для экологического мониторинга, создания нового поколения лекарств и усовершенствования вакцин.

Среди трематод одну из древних и высокоспециализированных групп представляют кровяные сосальщики птиц и млекопитающих из семейства Schistosomatidae. Структурная организация и эволюция генома этой группы до сих пор слабо изучена. К 2007 г. получены полные последовательности белок-кодирующих генов мт генома шистосом млекопитающих из рода *Schistosoma* [Zarowiecki et al., 2007]. Полные последовательности ядерных геномов расшифрованы лишь в 2009 г. для двух представителей этого рода – *S. mansoni* и *S. japonicum*, вызывающих тяжелые поражения мочеполовой системы и органов пищеварения человека [Berriman et al., 2009; Liu et al., 2009]. Различные виды и штаммы шистосом подробно изучены с помощью маркеров ядерного и митохондриального генома, что позволило подтвердить выделение внутри рода четырех основных морфо-экологических групп, а также выявить ряд новых закономерностей в распределении и происхождении латино-американских и афро-азиатских видов и популяций [Rollinson 1996; Locker et al., 2003].

Менее изучены повсеместно распространенные кровяные сосальщики птиц, а именно сосальщики из рода *Trichobilharzia*, личинки которых являются возбудителями церкариального дерматита человека (бильгарциоза или “лихорадки купальщика”). Их объединяют в большой род, содержащий около 40 видов, для которых основным дефинитивным хозяином являются птицы из отряда Anseriformes. В Европе известны три вида висцеральных (т. е. паразитирующих в кровеносных сосудах внутренних органов птицы) вида – *T. szidati*, *T. franki*, *T. salmanticensis*, и один назальный вид *T. regenti*, паразитирующий в носовой полости и центральной нервной системе птиц. При экспериментальном заражении показан более высокий патогенный эффект для млекопитающих церкарий назальной формы [Horak et al., 1999; 2002]. В настоящее время известен полный мт геном лишь для *T. regenti*, имеющий около 60% сходства с азиатским видом *S. japonicum* в структуре белок-кодирующих генов и их аранжировке [Webster et al., 2007].

Ввиду высокого морфологического сходства шистосом из рода *Trichobilharzia* только применение молекулярных маркеров позволяет идентифицировать видовую

принадлежность церкариальных изолятов. Одними из наиболее эффективных маркеров оказались последовательности двух внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК (ITS1 и ITS2) [Dvorak et al., 2002]. С их помощью удалось провести видовую диагностику европейских шистосом и показать различия в структуре консервативных и вариабельных участков рДНК. Изучено распространение трех видов шистосом (*T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti*) в водоемах Чехии, Польши, Франции, Исландии [Rudolfová et al., 2005, 2007; Aldhoun et al., 2009; Jouet et al., 2009, 2010]. В некоторых сообщениях использованы последовательности мт гена *cox1* для демонстрации межвидовых отличий птичьих шистосом с территории Франции и Исландии [Jouet et al., 2009, 2010]. Практически неизученным остается представитель другого широко распространенного в Евразии монотипного рода птичьих шистосом - *Bilharziella polonica*. Считается, что в отдельных случаях церкарии этого вида, наряду с трихобильгарциями, могут вызывать “лихорадку купальщика” [Szidat, 1938; Horak and Kolarova 2000; Zbikowska, 2003].

Цель и задачи исследования. Цель работы – с помощью молекулярно-генетических маркеров (методов) изучить особенности структурной организации и дивергенции ядерных и митохондриальных генов птичьих шистосом разных видов из родов *Trichobilharzia* и *Bilharziella*, обитающих на территории России и Беларуси.

Основные задачи:

1. Оценить особенности структурного полиморфизма последовательностей рДНК (28S, ITS1, ITS2) и генов мтДНК (*cox1*, *cox3*) птичьих шистосом из двух родов.
2. На основании сравнения с известными последовательностями ядерных и митохондриальных генов провести видовую дифференциацию изученных изолятов шистосом.
3. Разработать молекулярно-генетическую систему видовой идентификации шистосом рода *Trichobilharzia*.
4. На основании полиморфизма ITS2 рДНК провести видовую молекулярно-генетическую идентификацию промежуточных хозяев-моллюсков из семейства Lymnaeidae и оценить уровни гостальной специфичности в группе видов птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia*.
5. Реконструировать возможную историю происхождения и филогенетические связи птичьих шистосом, распространенных на территории Евразии.

Научная новизна и практическое значение работы. Впервые выделены и охарактеризованы последовательности ядерного и митохондриального генома неизвестного ранее вида птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* – *T. sp. var. narochanica*. У пяти видов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* и *Bilharziella*, обитающих на

территории России и Беларуси, обнаружена сложная филогеографическая структура, отражающая незавершенные процессы сортировки мтДНК и рДНК при расселении и адаптации паразита к разным видам промежуточных хозяев-моллюсков. Впервые для птичьих шистосом показана внутригенная и межпопуляционная изменчивость ITS1 рДНК на примере одного из четырех видов, а именно у *T. franki*. На основе последовательностей 28S рДНК разработана новая молекулярно-диагностическая система для детекции птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* на стадии промежуточного хозяина – моллюска. Данная система пригодна для мониторинга природных очагов возбудителей церкариального дерматита человека.

Полученные результаты имеют практическое значение для быстрой детекции и видовой идентификации возбудителей бильгарциозов, что значительно повышает эффективность санитарно-эпидемиологических мероприятий, направленных на выявление природных очагов бильгарциозов и разработку методов борьбы с ними. Они могут найти применение при разработке медико-ветеринарных программ в соответствующих учреждениях РАН и РАСХН, таких как Центр Паразитологии ИПЭЭ РАН, Всероссийский Институт Гельминтологии им. К. И. Скрябина, в ветеринарных академиях, институтах, факультетах и других учреждениях медико-ветеринарного профиля.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 10-ом европейском мультиколлоквиуме по паразитологии (France, Paris, 24-28 августа 2008 г.), IV Всероссийском Съезде Паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения» (Санкт-Петербург, Россия, 20 - 25 октября 2008 г.), III международной школе молодых учёных, (Звенигород (Московская обл.), 1-5 декабря 2008 г.), международной конференции «Биоразнообразие и экология паразитов наземных и водных ценозов» (Москва, 9-11 декабря 2008 г.), V съезде Вавиловского Общества генетиков и селекционеров (Москва, 21-28 июня 2009 г.), III межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока, посвященной 80-летию профессора Константина Петровича Фёдорова (15-20 сентября 2009 г.), 8-ой национальной конференции по паразитологии (Варна, Болгария 23-26 сентября 2009 г.), 2-ой международной конференции «Молекулярная филогенетика» (Москва, 18-21 мая 2010 г.), международной конференции «Теоретические и практические проблемы паразитологии» (Москва, 30 ноября – 3 декабря 2010 г.), а также межлабораторном семинаре ИБГ РАН (31 марта 2011 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе, 3 статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы, включающего _____ наименований. Работа содержит 17 таблиц и 23 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы церкарии и мариты птичьих шистосом родов *Trichobilharzia* и *Bilharziella*, собранные в 2005-2010 г.г. из моллюсков (церкарии) или утиных птиц (мариты), обитающих в 7 пресноводных водоемах России (г. Москва, Московская и Новосибирская области) и 5 водоемах Белоруссии (озера Нарочь, Мясстро, Большие Швакшты, Полоневичи и р. Скема). Для построения дендрограмм использованы последовательности шистосом и их промежуточных хозяев-моллюсков семейства Lymnaeidae, аннотированные в GeneBank (N=35). Всего исследовано 142 церкариальных изолята и 6 половозрелых марит, получено около 400 новых последовательностей генома шистосом и 30 последовательностей ITS2 рДНК моллюсков из родов *Radix*, *Lymnaea*.

Для амплификации и секвенирования последовательностей ITS1, ITS2, 28S рДНК, мт *cox1*, *cox3* генов шистосом, а также ITS2 рДНК моллюсков применяли опубликованные ранее известные [Dvorak et al., 2002; Itagaki et al., 1998; Lockyer et al., 2002; Bargues et al., 2003] и разработанные нами специфичные праймеры. Определение нуклеотидного и аминокислотного состава, оценку нуклеотидного (π) и гаплотипического (h) разнообразия, D- и Z- тесты на нейтральность нуклеотидных замен осуществляли с помощью программ MEGA ver. 4.1 и ARLEQUIN ver 3.11. Выбор модели нуклеотидных и аминокислотных замен проводили с помощью иерархического теста альтернативных моделей в программе Modeltest v. 3.06 (PAUP 4.0b). Программы PhyML ver. 3.0 и MEGA ver. 4.1 применяли для реконструкции филогенетических деревьев методами «ближайшего соседа» (NJ), максимальной парсимонии (MP) и максимального правдоподобия (ML). Для построения парсимониальных сетей использовали программы TCS ver. 1.3 и SplitsTree v.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Полиморфизм ITS2 рДНК птичьих шистосом из родов *Trichobilharzia* и *Bilharziella*.

Для видовой идентификации птичьих шистосом использован второй внутренний транскрибируемый спейсер рДНК (ITS2), успешно применяемый ранее для дифференциации трех европейских видов рода *Trichobilharzia* – *T. szidati*, *T. regenti*, *T. franki* [Dvorak et al., 2002]. Все три вида обнаружены на российской и белорусской части

исследованного ареала. Они с высокой достоверностью (ИБ=61-99%) образуют отдельные кластеры на дендрограмме генетических различий (Рис. 1). Кроме известных последовательностей ITS2 рДНК *T. regenti*, *T. szidati* и *T. franki* у шистосом с территории Беларуси найдены 35 ранее неизвестных ранее последовательностей нового вида, названного нами *T. sp. var. narochanica* (*T. narochanica*). Они не отличаются по длине (322 п.н.) от последовательностей *T. franki* и *T. regenti* и формируют базальную видовую кладу внутри рода *Trichobilharzia*.

Длина последовательностей ITS2 рДНК всех изолятов *B. polonica* из белорусской, чешской и французской популяций составила 338 п.н. В составе всех последовательностей обнаружен только один вариабельный сайт (транзиция А→G) в положении 267. Гомо- и гетерозиготы по аллелю G найдены в белорусских популяциях, а на территории Чехии и Франции (по данным GenBank) найдены лишь гомозиготы AA. Соотношение генотипов в суммарной выборке составило 20 (AA): 6 (AG): 2 (GG) т.е. 71.4%: 21.4%: 0.7% при частотах аллелей pA=0.84 и pG=0.16.

Табл.1. Характеристика полиморфизма ядерных (ITS2 рДНК) и митохондриальных (*cox1*, *cox3*) генов птичьих шистосом из российских и белорусских популяций.

Вид	Линии	ITS2 рДНК (L=318-324 п.н.)		<i>cox1</i> (L=1125п.н.)				<i>cox3</i> (L=651)			
		N	V,%	N	V,%	π , %	h	N	V,%	π , %	h
<i>T. szidati</i>		19	0.6	15	4.2	0.008	1.0	12	3.4	0.008	0.98
<i>T. regenti</i>		5	0	5	0.09	0.004	1.0	5	1.5	0.007	1.0
<i>T. narochanica</i>	A	32	0.3	6	1.2	0.006	1.0	3	1.4	0.009	1.0
	B	3	0	3	1.4	0.01	1.0	3	0.9	0.006	1.0
	Σ	35	0.3	9	2.0	0.007	1.0	6	20.2	0.117	1.0
<i>T. franki</i>	ПА	9	0	9	3.6	0.009	0.98	8	2.5	0.007	1.0
	ПВ	6	0	7	2.7	0.009	1.0	6	4.3	0.009	1.0
	I (Москва)	5	0	5	0.6	0.002	1.0	5	1.7	0.009	1.0
	III (Сибирь)	3	0	3	0.7	0.005	1.0	3	0.6	0.004	1.0
	Σ	23	1.2	24	19.2	0.07	1.0	22	22.1	0.07	1.0
<i>B. polonica</i>		18	0.3	18	1.9	0.004	0.85	-	-	-	-

Обозначения: N-число последовательностей; L- длина последовательностей; V-число вариабельных сайтов; π и h - среднее нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие.

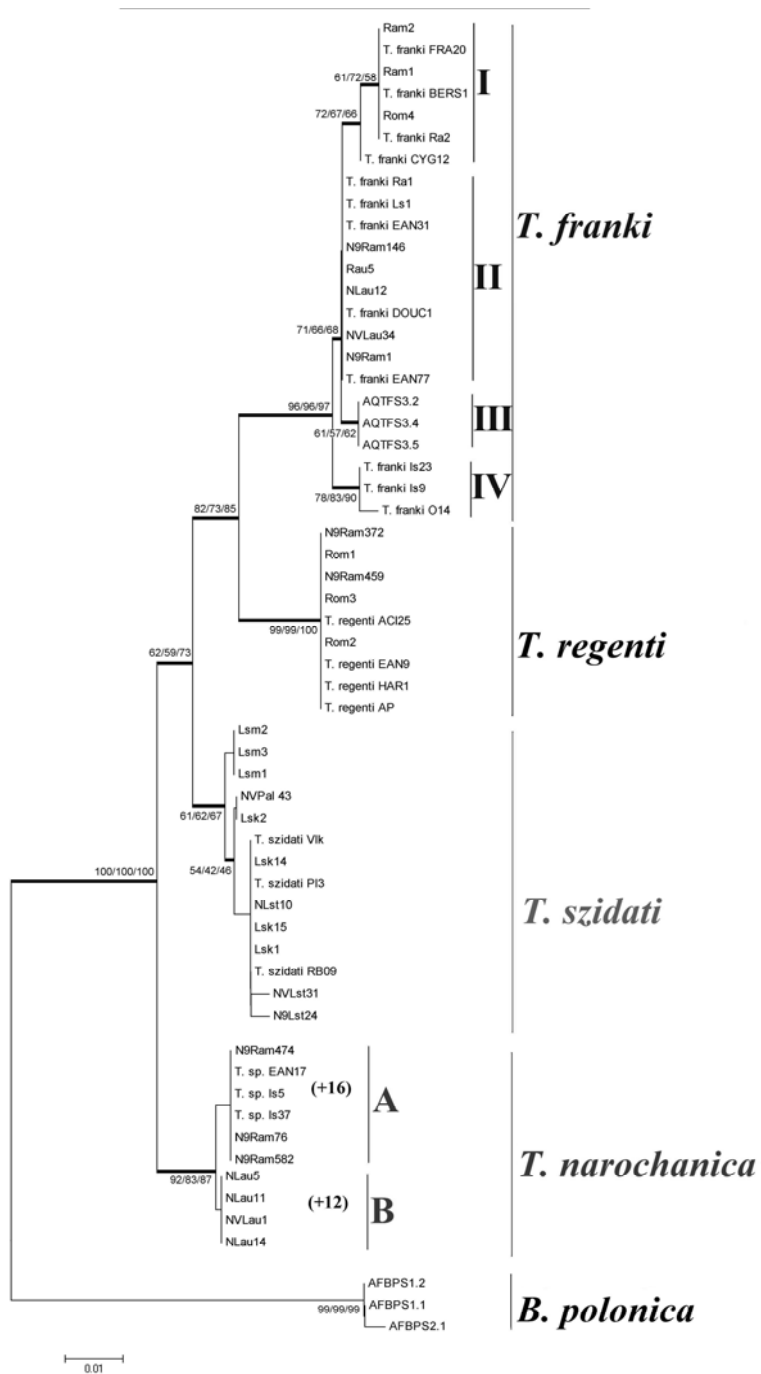


Рис. 1. Полиморфизм ITS2 рДНК в суммарной выборке птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* из европейских, российских и белорусских популяций. Модель замещений $-TN+I$ ($-\ln L = 755.225$, $AIC = 1806.376$). В узлах ветвления обозначены индексы бутстрепа ($>50\%$), полученные при использовании методов ML/MP/NJ.

Мутационные изменения в последовательностях рДНК вызваны преимущественно транзициями. Среди четырех видов наибольшее число переменных сайтов обнаружено в ITS2 у *T. szidati* (4) и *T. franki* (7) (Табл.1). Последовательности всех известных изолятов *T. regenti* – трех российских, двух белорусских и изолятов с территории Франции и Чехии ($n=21$), оказались идентичными, и формируют неразветвленную кладу. Более гетерогенной оказалась выборка *T. szidati*, в которой можно выделить 2 или 3 дифференцированные

группы. Однако статистическая поддержка этих групп составила лишь 46-67%. Две дивергировавшие группы последовательностей, А и В (ИБ> 87%), найдены среди изолятов *T. narochanica*. Шистосомы группы А найдены также в Исландии (n=9) и Франции (изолят EAN17).

Последовательности *T. franki* объединены, по меньшей мере, в четыре группы. Две линии формирует основная масса европейских изолятов из московской популяции, Франции, Чехии (N=12) (линия I), а также идентичные между собой последовательности *T. franki* из Белоруссии (линия II). Уникальные последовательности обнаружены у трех марит, паразитирующих на *A. querquedula* из Новосибирской области (ИБ>56%) (линия III), а также для трех церкариальных изолятов из Исландии (ИБ>78%) (линия IV).

2. Полиморфизм 28S рДНК.

Для подтверждения видового статуса *T. sp. var. narochanica* и внутривидовой неоднородности *T. franki* нами определена нуклеотидная последовательность гена 28S рРНК. Ранее эти последовательности опубликованы для видов *T. szidati*, *T. regenti* и *B. polonica*, *D. pulverulenta*, *G. huronensis* [Lockyer et al., 2002].

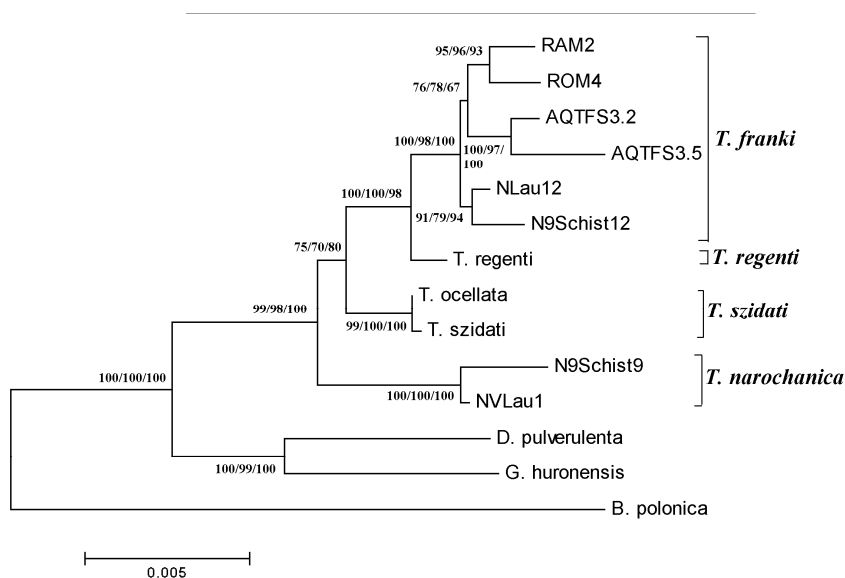


Рис. 2. Полиморфизм 28S рДНК в российских, белорусских и европейских изолятах шистосом из рода *Trichobilharzia*. Модель замещений – HKY+G (– lnL= 7094.917, AIC= 14249.869). В узлах ветвления обозначены индексы бутстрепа (>50%), полученные при использовании трех методов ML/MP/NJ.

Для секвенирования выбраны по одному изоляту из линий А и В *T. narochanica* (NVLau1 и N9Schist9) и по два изолята из трех линий *T. franki* (Ram2, Rom4, AQTF3.2, AQTF3.5, NLau12 и N9Schist12). Длина последовательностей 28S рДНК у всех видов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* составила 3870 п.н. Данный локус является достаточно консервативным, о чем свидетельствует низкое значение показателя V. Так, число

вариабельных сайтов у *T. franki* составило 43 (1% от общей длины последовательности), а для *T. narochanica* оказалось еще меньше – 11 (0.26%). На дендрограмме (Рис. 2) предполагаемый новый вид *T. sp. var. narochanica* выделяется в отдельную группу. Шесть изолятов *T. franki* разделены, как и по ITS2 рДНК, на три подкластера (ИБ>50%). Один подкластер образован последовательностями церкариальных изолятов из Москвы (Ram2 и Rom4), второй – последовательностями двух марит из Новосибирской области (AQTF3.2 и AQTF3.5), а третий кластер содержит последовательности двух белорусских церкариальных изолятов (NLau12 и N9Schist12).

3. Разработка молекулярно-генетической системы для видовой диагностики птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* на основании полиморфных рДНК.

На Рис. 3. представлены результаты выравнивания наиболее полиморфного участка гена 28S рДНК – D2-домена четырех видов птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* – *T. szidati*, *T. franki*, *T. regenti* и *T. var. narochanica*. На основании этого выравнивания мы подобрали четыре праймера к четырем консервативным участкам последовательности D2-домена 28S рДНК и опробовали их для разработки системы видовой диагностики птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* (Рис. 3, 4).



Рис. 3. Выравнивание последовательностей D2-домена 28S рДНК четырех видов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia*. Последовательности четырех диагностических праймеров представлены на отдельных строчках, участки гомологии выделены затемненной рамкой.

На первом этапе проводится ПЦР, позволяющая дифференцировать три из четырех видов трихобильгарций. Особенность этого этапа состоит в использовании трех праймеров – одного прямого F1-Tr и двух обратных (R1-nar, R4-nar). Прямой праймер (F1Tr) является универсальным, так как комплементарен консервативному у всех четырех видов 5' - участку 28S рДНК. Первый обратный праймер R1-nar подобран к участку гомологии для пары видов *T. szidati* и *T. var. narochanica*. Второй обратный праймер (R4-

nar) отжигатся вместе с праймером F1-Tr только на ДНК двух видов - *T. var. narochanica* и *T. regenti*. Таким образом, набор из одного прямого универсального и двух обратных праймеров в зависимости от последовательности матричной ДНК на первом этапе в одной реакции может давать один (для *T. szidati* и *T. regenti*), два (для *T. regenti*), или ни одного (на ДНК *T. franki*) ампликона.

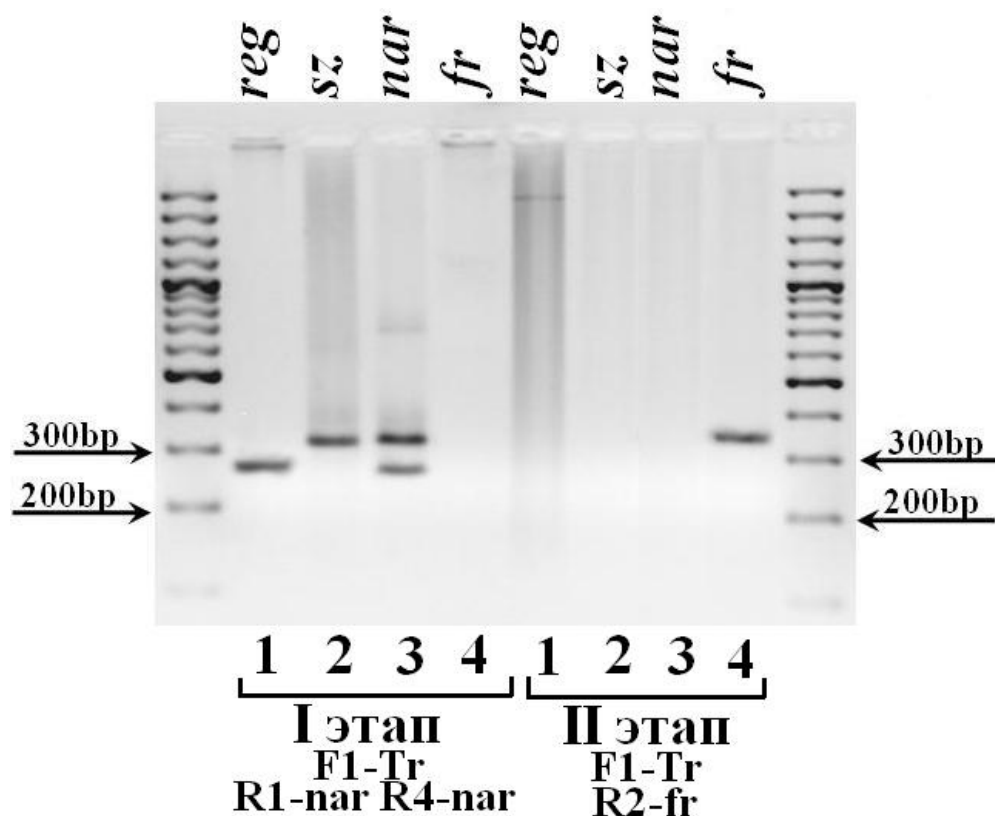


Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации с диагностическими праймерами для четырех видов шистосом: *T. regenti* (reg), *T. szidati* (sz), *T. narochanica* (nar), *T. franki* (fr). I этап - три праймера (F1Tr, R1nar, R4nar), II этап- два праймера (F1Tr, R2fr).

Если в качестве матрицы будет использована ДНК *T. szidati*, то на фореграмме ожидается один фрагмент длиной 316 п.н. В результате амплификации ДНК *T. regenti* также образуется только один ПЦР-продукт, но длиной 255 п.н. Амплификация с использованием ДНК *T. var. narochanica* должна приводить к образованию двух продуктов – длиной 316 и 255 п.н.

Амплификация ДНК *T. franki* с тремя вышеуказанными праймерами не приводит к образованию ампликонов. Поэтому для подтверждения видовой принадлежности *T. franki* проводится второй, дополнительный этап ПЦР, где в качестве прямого используется все тот же универсальный праймер F1-Tr, а в качестве обратного - праймер R2-fr, комплементарный специфичному участку D2-домена 28S рДНК *T. franki*. Ожидаемый единственный ампликон имеет размер 258 п.н. (Рис. 4). Фрагменты, полученные в результате

двух амплификаций, элюировали из геля и секвенировали. Нуклеотидные последовательности пяти продуктов имели предсказанный нами размер (316 п.н., 255 п.н., 258 п.н.) и содержали участки последовательностей D2-домена 28S рДНК соответствующих видов рода *Trichobilharzia*. Этот простой и дешевый способ пригоден не только для мониторинга природных очагов возбудителей церкариального дерматита человека. Он позволяет сразу, без секвенирования сортировать для дальнейшего исследования определенные виды шистосом из рода *Trichobilharzia*.

4. Полиморфизм ITS1 рДНК птичьих шистосом рода *Trichobilharzia*.

Для более детального изучения филогенетических взаимосвязей проанализирован состав последовательностей ITS1 рДНК у 89 изолятов трихобильгарций из белорусской и российской популяций, а также шистосом из Франции, Исландии, Чехии и Польши. Нуклеотидные последовательности ITS1 у разных видов сильно отличались по длине. Так, самая короткая последовательность обнаружена у вида *T. szidati* – 746 п.н., а самая длинная – у *T. regenti* (1325 п. н.). Длина ITS1 у *T. sp. var. narochanica* составляет 964 п.н, а у *T. franki* варьирует у разных изолятов от 788 п.н. до 1090 п.н.

Все четыре вида содержат на 5' и 3'-концах консервативные области размером 82 и 350 нуклеотидов, соответственно. 5'- Участки у *T. szidati* и *T. sp. var. narochanica* содержат по 2 переменных сайта. *T. regenti* содержит в 5'-консервативной области 3, а *T. franki* - 9 полиморфных сайтов, обусловленных единичными точечными мутациями. 3'- Консервативная область ITS1 идентична у всех изученных изолятов *T. regenti*. Изоляты *T. szidati* отличаются между собой тремя точечными мутациями и инсерцией одного нуклеотида, встречающейся только у трех московских изолятов (Lsm4, Lsm7, Lsm20). Вид *T. sp. var. narochanica* содержит в 3'-консервативном участке 6, а *T. franki* – 17 полиморфных сайтов.

Кроме мутационного полиморфизма консервативных участков для каждого вида показаны различия по числу и структуре повторяющихся звеньев в составе ITS1 (Рис. 5). В последовательностях *T. regenti* содержится блок из шести тандемно организованных повторов. Длина первых пяти повторов одинакова и составляет 111 п.н. за исключением некоторых европейских изолятов, у которых найдены укороченные копии второго и пятого повтора за счет инсерции одного нуклеотида. По сравнению с пятью основными звеньями, последний, шестой повтор во всех образцах укорочен с 3'-конца и его длина составляет 83 п.н. Количество полиморфных сайтов внутри повторов варьирует от шести до 16.

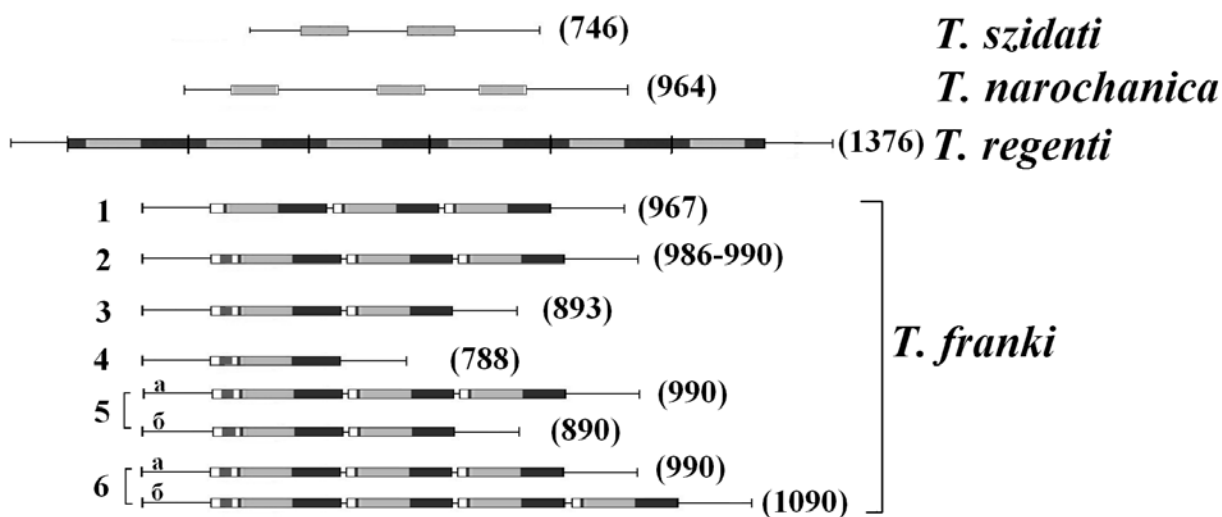


Рис. 5. Структура последовательностей ITS1 рДНК четырех видов птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia*. Прямоугольниками обозначены повторы, гомологичные участки в повторах отмечены одним и тем же цветом, цифрами от 1 до 6 – генотипы ITS1. В скобках указаны размеры последовательностей в п. н.

Последовательность ITS1 *T. szidati* содержит два повторяющихся звена длиной по 45 п.н., разделенных между собой длинным участком 53 п.н. Два звена отличаются между собой одной заменой и двумя инсерциями. Все изоляты данного вида практически идентичны по структуре первого повтора и отличаются только двумя точковыми мутациями, одна из которых найдена у шистосом из Сибири, вторая встречается у двух церкариальных изолятов из белорусской и московской популяции (Lsm20 и NLst4). Последовательности второго повторяющегося звена также отличались только по двум сайтам, характерным для одного изолята из Польши.

Для *T. sp. var. narochanica* в составе ITS1 показано наличие трех повторов длиной по 44 п.н. Все три повтора отличаются между собой по 13 полиморфным сайтам. Расстояние между первым и вторым повтором составляет 91 п.н., а между вторым и третьим – 50 п.н. Структура первого повторяющегося звена идентична для всех изученных изолятов. Второе звено имеет в составе один полиморфный сайт, а третий повтор содержит две точковые мутации в последовательностях двух изолятов.

Высокая внутривидовая гетерогенность последовательностей ITS1 рДНК наблюдается у *T. franki*. Для большинства изученных изолятов данного вида характерна последовательность ITS1 длиной 986-990 п.н., в состав которой входят три повторяющихся звена, разделенных между собой короткой последовательностью 9 п. н. (Рис. 5, генотип 1, 2).

Длина последовательностей ITS1 шистосом из исландских (линия IV) и сибирских (линия III) популяций составляет 893 и 788 п.н., соответственно, и это вызвано отсутствием одного или двух последних звеньев (Рис. 5, варианты 3 и 4).

Наиболее распространены варианты, у которых длина первого повторяющегося звена - 126 или 102 п.н. Повтор длиной 126 нуклеотидов найден у шистосом из Исландии (Is25), Франции (DOUC1) и у всех белорусских изолятов *T. franki* из линии II. У других исландских изолятов были найдены похожие варианты звена длиной от 127 до 129 п.н, имеющие одно- и динуклеотидные вставки в поли-А участках. У московских изолятов *T. franki* (линия I, генотип 1 на рис. 5) длина первого звена укорочена за счет инсерции 26 нуклеотидов. Но наиболее сильно отличаются по составу последовательность единственного повтора у трех марит из Сибири (линия III, генотип 4). Второе звено ITS1 *T. franki* менее вариабельно и представлено в изученных нами популяциях только одним вариантом длиной 91 п.н. Этот повтор отличается от первого звена делецией первых 11 п.н. Третье повторяющееся звено в составе ITS1 рДНК *T. franki* у большинства изученных изолятов состоит из 92 нуклеотидов. Такой вариант повтора встречается в московской, белорусской, французской популяциях.

Помимо межвидовой и популяционной изменчивости у четырех белорусских изолятов *T. franki* обнаружен индивидуальный геномный полиморфизм ITS1 рДНК. При электрофоретическом разделении ПЦР-продуктов трех изолятов NLau12, N10Sch4 и N10v7 (линия II по ITS2 на Рис.1) было выявлено два генотипа, представленных двумя фрагментами разной длины (Рис.6, дор. 1 и 2). Сравнение структуры шести ПЦР-продуктов (по два фрагмента от изолята) показало, что все они представляют собой различные варианты ITS1 рДНК и различаются между собой в основном за счет числа повторяющихся звеньев и некоторых точковых мутаций в консервативных областях.

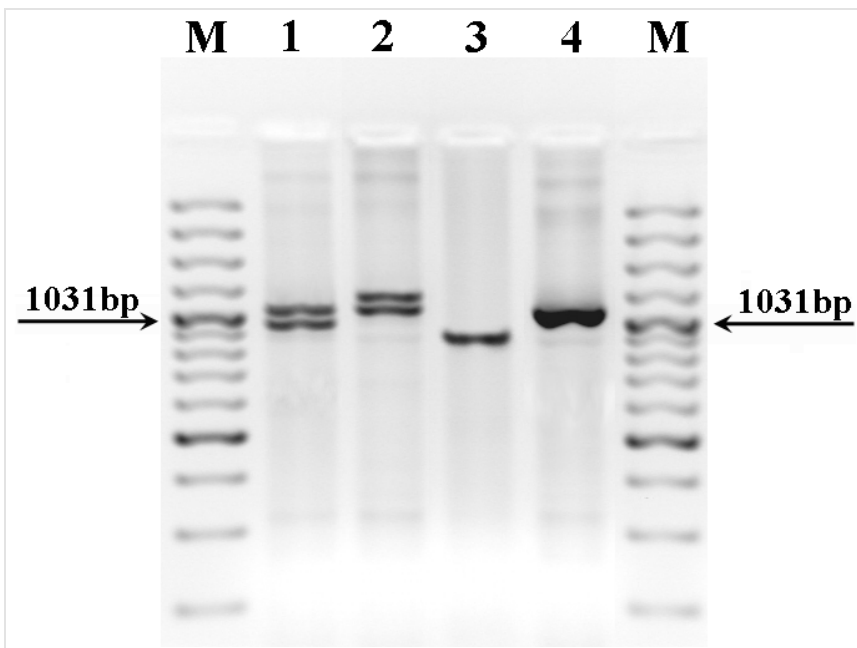


Рис. 6. Индивидуальная (внутригеномная) и популяционная изменчивость ITS1 рДНК, обнаруженная в церкариальных изолятах *T. franki* из Беларуси (дорожки 1, 2, 4), Московского региона (дор. 4) и Новосибирской области (дор.3). М - маркер молекулярных масс 100 bp (Fermentas) с указанием мажорного фрагмента длиной 1031 п.н.

Изолят NLau12 содержит в геноме два варианта последовательностей или две копии ITS1 (Рис. 6 дор.1, Рис. 5, генотип 5), одна из которых (5а) идентична ITS1 для большинства белорусских изолятов (Рис.5 , генотип 2). Вторая копия ITS1 NLau12 (5б) отличается по длине от первой за счет делеции третьего повторяющегося звена и имеет высокое сходство (99%) с последовательностью ITS1 исландских шистосом (Рис. 5, генотип 3). Одна из копий ITS1 изолятов N10Sch4 и N10v7 (Рис.6, дор. 2, Рис. 5, генотип 6) представляет наиболее распространенный вариант ITS1 размером 990 п.н. (Рис. 5, генотип ба). Вторая копия большей длины (1090 п.н., рис. 5, генотип бб), имела в своем составе дополнительный четвертый повтор, который полностью идентичен по составу третьему повторяющемуся звену.

5. Полиморфизм митохондриальных генов (*cox1*, *cox3*) и генеалогические линии птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* и *B. polonica*.

Для более детального изучения межвидовой дифференциации и выявления генеалогической структуры у видов рода *Trichobilharzia* в качестве маркеров использовали два митохондриальных гена – *cox1* и *cox3*, а для *B. polonica* – только ген *cox1*.

С помощью праймеров, предложенных ранее для дифференциации видов шистосом млекопитающих [Lockyer et al., 2002] получены 53 последовательности гена *cox1* (1125 п.н.) для церкариальных изолятов из белорусской (n=29) и российской (Москва, Московская и Новосибирская области, n=17) популяций, а также трех марит *T. franki* из новосибирской популяции. Большинство обнаруженных замен вызваны транзициями, и

преобладание транзиций над трансверсиями наиболее очевидно у *T. szidati* (5.7), тогда как для трех других видов характерны более низкие значения этого показателя: 2.5, 2.1 и 1.5 у *T. narochanica*, *T. franki* и *T. regenti*, соответственно.

Обнаружено весьма низкое нуклеотидное разнообразие у видов *T. regenti* и *T. szidati* (0.004 и 0.008), в трех линиях (I-III), выделенных в группе *T. franki* на основании полиморфных ITS2 рДНК (0.002-0.009), а также в линии А у *T. sp. var. narochanica* (0.004). Для линии В этого же вида характерно максимальное значение π (0.01). Гаплотипическое разнообразие оказалось одинаково высоким для всех видов ($h=98-100\%$), что свидетельствует о генетической уникальности практически каждой из последовательностей гена *cox1* в изученной выборке шистосом (Табл.1). Подавляющее большинство мутаций затрагивают третье основание в кодонах и не приводят к изменению аминокислотной последовательности COI каждого из видов. Отношение несинонимичных и синонимичных замен для каждой из выборок не превышает 1. На нейтральность обнаруженных замен в последовательностях *cox1* указывают результаты сравнения средних значений числа нуклеотидных различий (D-статистика) или отношения синонимичных и несинонимичных замен (Z-статистика) между парами последовательностей. По этим показателям мы не обнаружили значимых отличий между последовательностями каждого из четырех видов.

Низкое нуклеотидное и высокое гаплотипическое разнообразие характерны и для церкариальных изолятов *B. polonica* (Табл.1). Как и у трихобильгарций, длина исследованного фрагмента *cox1* для 18 церкариальных изолятов *B. polonica*, инфицирующих моллюсков *Planorbarius corneus* (сем. Planorbidae) из трех белорусских водоемов, а также одной мариты с территории Украины (AY157186) составила 1125 п.н. (375 аминокислот). В последовательностях *cox1* обнаружен 21 полиморфный сайт, что составляет 1.9 % от общей длины анализируемого локуса (Табл.1). Большая часть замен вызвана транзициями в третьем положении кодонов (соотношение транзиции/трансверсии составляет 4.92) и приводят к синонимичным заменам. Общее число гаплотипов составляет 11, а величина нуклеотидного и гаплотипического разнообразия π достигает значения 0.004 % и 85.6 %, соответственно. Мы не обнаружили среди гаплотипов пяти видов инсерций, делеций и «стоп»-кодонов, что свидетельствует об отсутствии среди изученных последовательностей ядерных копий *cox1*.

В нуклеотидной последовательности гена *cox3*, как и гена *cox1*, у четырех видов птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* преобладали АТ-основания (69.9%-71.2%). Наименее вариабельные последовательности *cox3* характерны для видов *T. regenti* и *T. szidati*, у которых доля вариабельных сайтов (V) составила 1.5% и 3.4%, соответственно. Вариации этого показателя между линиями А и В у *T. sp. var. narochanica* составили 0.9-

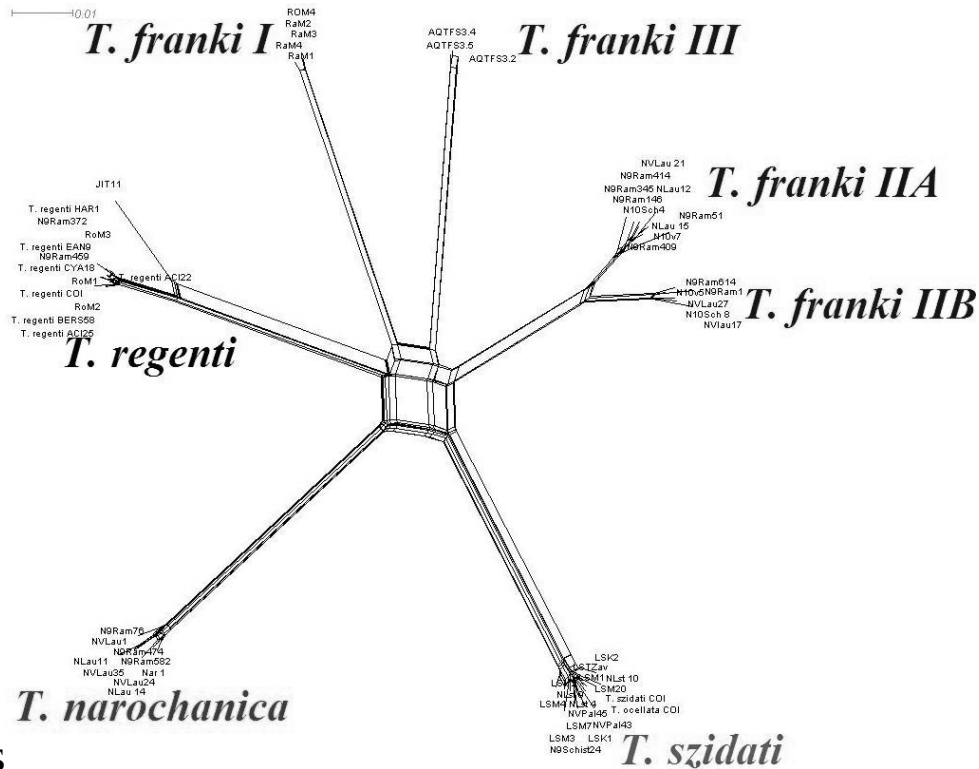
1.4%, а между линиями *T. franki* 0.6-4.3% (Табл.1). Четыре вида отличаются по соотношению числа транзиций и трансверсий. Так у *T. regenti*, *T. franki* и *T. szidati* число транзиций существенно преобладает над числом трансверсий, а у *T. sp. var. narochanica* это отношение равно единице. Число синонимичных замен значительно выше по сравнению с несинонимичными у *T. franki* и *T. narochanica* ($42/102=0.4$ и $46/84=0.55$, соответственно). У вида *T. szidati* это соотношение равно $10/12=0.83$, а у *T. regenti* число несинонимичных и синонимичных замен одинаково ($5/5$). Как и в случае *cox1*, гаплотипическое разнообразие оказалось одинаково высоким для всех видов ($h=100\%$) а нуклеотидное разнообразие в последовательностях гена *cox3* варьирует в пределах 0.004-0.009 у видов и линий, выделенных на основании полиморфизма ITS2 рДНК. Одна интересная особенность в структуре последовательностей *cox3* отмечена во всех трех изолятах *T. narochanica*, формирующих линию В - они заканчиваются нетрадиционным триплетом АГТ вместо типичного для мт генома птичьих шистосом стоп-кодона ААТ.

Последовательности мт гена *cox1* и *cox3* использованы для построения филогенетических деревьев (эти громоздкие данные приведены в основной рукописи). В дополнение к ним построены парсимониальные сети двух типов, более наглядно и более детально представляющие взаимосвязи между отдельными гаплотипами, линиями в пределах видов, а также между отдельными видами (Рис. 7 и 8).

Топология дендрограмм и структура сетей, отражающих дивергенцию четырех видов рода *Trichobilharzia*, трех линий *T. franki* (I-III) по *cox1* и ITS2, практически совпадает (Рис.1,2 и Рис. 7А). Дивергенция двух линий А и В *T. sp. var. narochanica* менее выражена при использовании мт гена *cox1* по сравнению с геном *cox3* и ITS2, 28S рДНК. Сравнение мт генома позволяет разделить линию II у *T. franki* на две дополнительные сублинии (IIА и IIВ на Рис. 7).

Наиболее простая филогеографическая структура характерна для *T. regenti*, сходная при сравнении гаплотипов *cox1* и *cox3* изолятов этого вида из российских, белорусских и чешских популяций (Рис.8). Более сложные взаимосвязи между гаплотипами *cox1* обнаружены в небольшой выборке белорусских изолятов у *B. polonica*. Среди них можно выделить, по крайней мере, две группы последовательностей, уровень дивергенции между которыми достигает 0.55 %. Напомним, что исследованные выборки *T. regenti* и *B. polonica* практически однородны по последовательностям ITS2 рДНК. Относительно несложную структуру с неявной дифференциацией формируют гаплотипы *cox*, *cox3* и ITS2 рДНК в выборке российских и белорусских изолятов *T. szidati*.

A



Б

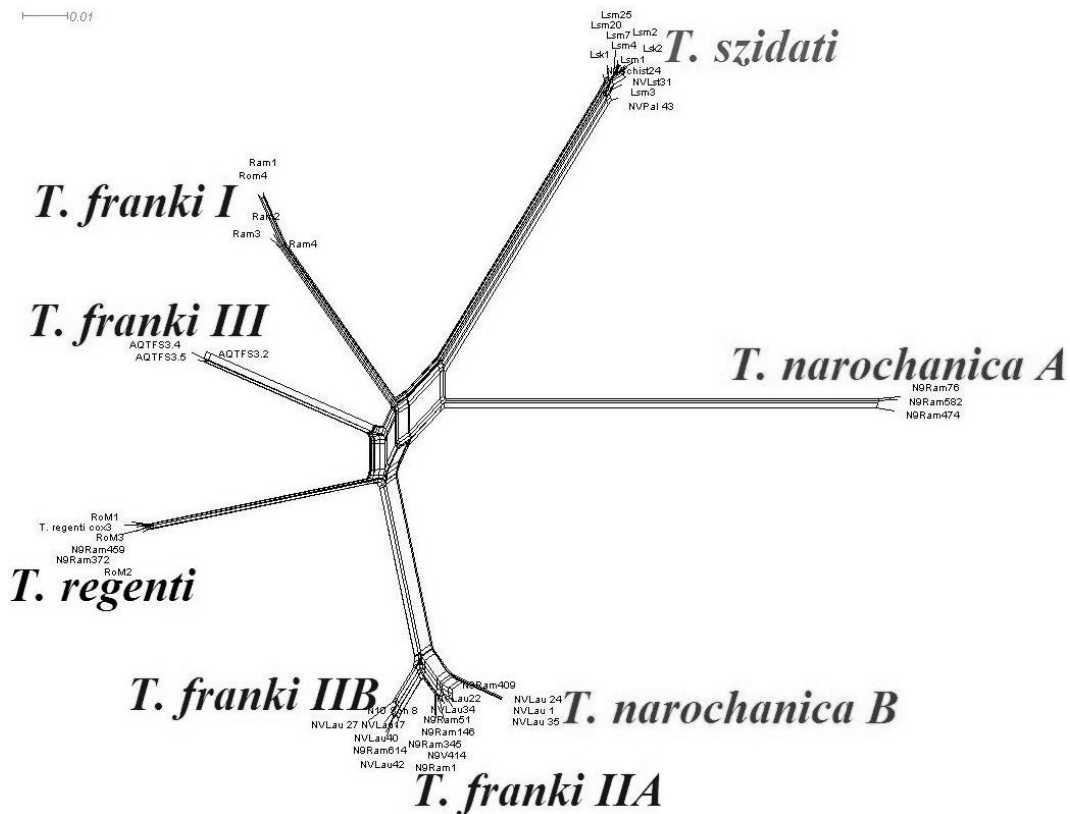


Рис. 7. Парсимониальные сети, или сплитграфы, характеризующие внутри- и межвидовую дифференциацию четырех видов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia*, построенные на основании полиморфизма мт генов *cox1* (А) и *cox3* (Б). Обозначение трех основных генеалогических линий *T. franki* (I, II, III) и двух линий *T. narochanica* (А и В) соответствует рис. 1.

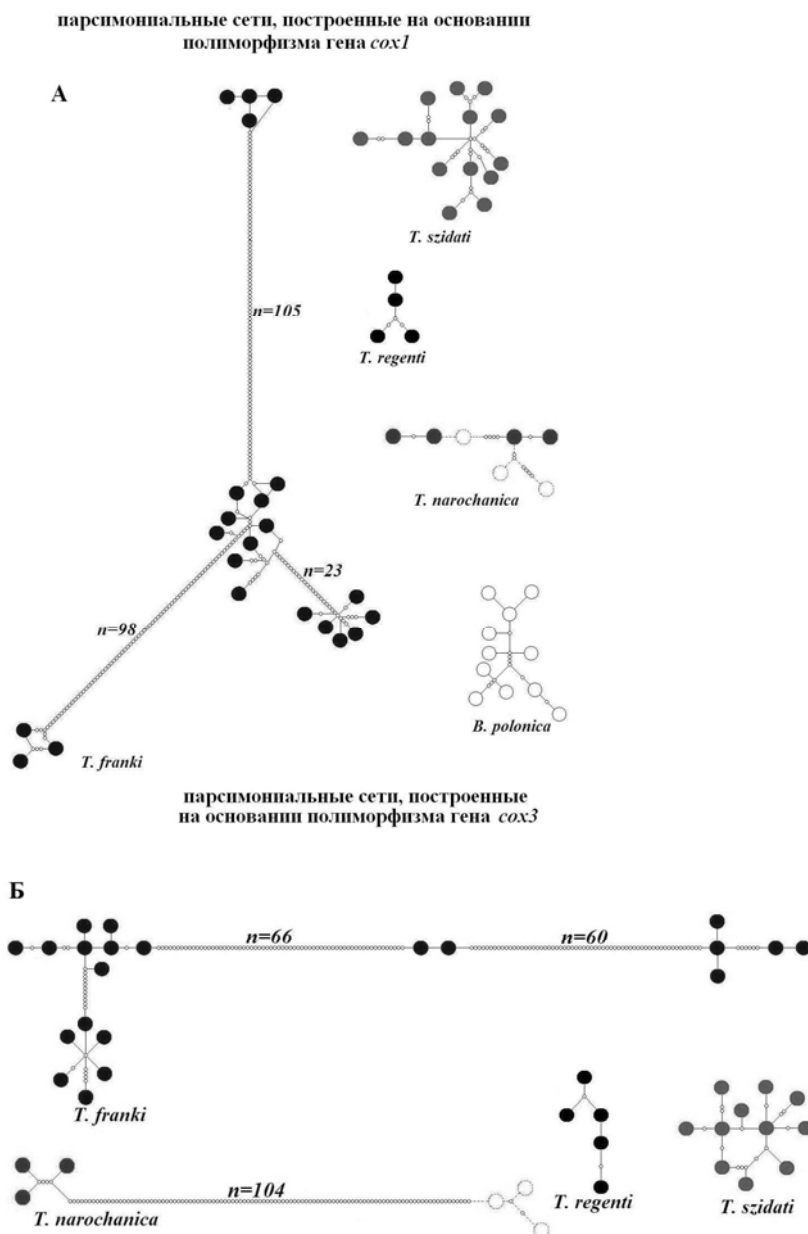


Рис. 8. Внутривидовая генеалогическая структура пяти видов птичьих шистосом, выявленная на основании полиморфизма мт генов *cox1* (А) и *cox3* (Б). Генотипы двух линии *T. narochanica* обозначены черным (линия А) и белым цветом (линия В). Предполагаемых промежуточные генотипы обозначены маленькими кружками, а их число (n) указано над ребрами.

Интерпретация расхождения генеалогических линий двух других видов - *T. franki* и *T. narochanica* весьма неоднозначна и имеет в настоящее время предварительный характер. Дивергенция ядерных генов и митохондриального гена *cox1* генов в этой группе носит согласованный характер (Рис.1, 2, 7А). Использование *cox3* демонстрирует иную дифференциацию четырех видов *Trichobilharzia* (Рис. 7Б). Совершенно неожиданно линии А и В нового вида *T. narochanica* расщепляются и обнаруживают сходство либо с геномом *T. szidati*, либо с геномом линии II *T. franki*. Изменяется при этом и относительное

взаиморасположение последовательностей мт генома *T. regenti* и двух других линий - I, III *T. franki*. Такое несоответствие в топологии дендрограмм или сетей может отражать незавершенные процессы сортировки предковых генеалогических линий, известные для организмов разного таксономического ранга. Об этом же свидетельствуют различия в структурах двух сетей, представленные на Рис. 8. Еще одним объяснением данного явления может являться наличие интрогрессивной гибридизации, последствия которой трудно разграничить с неполной сортировкой и требуют специального подтверждения.

6. Молекулярная дивергенция и гостальная специфичность птичьих шистосом рода *Trichobilharzia*.

На заключительном этапе исследования мы провели оценку гостальной специфичности исследованных видов шистосом рода *Trichobilharzia*. С этой целью с помощью ITS2 рДНК проведена видовая идентификация промежуточных хозяев – пресноводных моллюсков. Для сравнения использовали известные ранее последовательности ITS2 моллюсков из водоемов нескольких стран Европы, принадлежащие к пяти видам рода *Radix* (*R. auricularia*, *R. peregra*, *R. lagotis*, *R. labiata*, *R. ampla*) и пяти видам (*L. stagnalis*, *L. palustris*, *L. turricula*, *L. fuscus*, *L. corvus*) из рода *Lymnaea* [Bargues et al., 2003].

Дифференциация 34 инфицированных шистосомами моллюсков из рода *Radix* и 15 моллюсков из рода *Lymnaea* показана на двух дендрограммах (данные не приведены) и схематически представлена на Рис. 9. Исследованные нами моллюски объединились в три кластера, соответствующих трем видам рода *Radix* (*R. auricularia*, *R. lagotis*, *R. ampla*) и два кластера, соответствующих двум видам рода *Lymnaea* (*L. stagnalis*, *L. palustris*) .

Среди представителей рода *Lymnaea* к виду *L. palustris* можно отнести трех моллюсков из сибирских водоемов и двух моллюсков из оз. Нарочь. Последовательности ITS2 у них не отличаются от единственной известной последовательности *L. palustris*, характерной для моллюсков на территории Франции, Нидерландов и Германии. Моллюски *L. stagnalis* из московских и белорусских водоемов образуют единую группу с представителями данного вида из Франции, Германии и Италии с генотипами G1-G4. В обособленную от них группу (вероятно, с пятым по счету генотипом - G5) объединились три последовательности *L. stagnalis* из сибирских водоемов. 34 исследованных моллюска из группы *Radix* относятся к трем видам: *R. auricularia*, *R. lagotis*, *R. ampla*.

Сравнивая распределение разных видов *Trichobilharzia* на разных видах моллюсков из пресноводных водоемов Москвы, Западной Сибири, Беларуси и стран Европы (Рис. 9), можно сделать следующие выводы.

В водоемах Москвы мы обнаружили 9 моллюсков *L. stagnalis*, инфицированных *T. szidati*. В сибирских водоемах церкарии *T. szidati* паразитировали не только на *L. stagnalis*, но и на моллюсках *L. palustris*. Аналогичное распределение *T. szidati* среди двух видов моллюсков из рода *Lymnaea* характерно для озера Нарочь в Беларуси. Известны аналогичные ассоциации *T. szidati* и *L. stagnalis* в водоемах Франции [Jouet et al., 2005].

Как в водоемах Москвы, так и в реке Каргат все обнаруженные изоляты линии I *T. franki* паразитировали исключительно на моллюсках *R. auricularia*. Аналогичные взаимосвязи найдены для шистосом из Франции [Jouet et al., 2005,2010] и Италии [Cipriani et al., 2011]. На оз. Нарочь представители линии II *T. franki* обнаружены нами на моллюсках *R. ampla* и *R. lagotis*. Показано, что сходные с линией II по ITS2, D-2 домену 28S рДНК, *cox1* генотипы некоторых изолятов *T. franki* инфицировали во Франции и Исландии моллюсков *R. peregra* [Jouet et al., 2011].

Изоляты *T. regenti* паразитируют как в московских водоемах, так и на оз. Нарочь на *R. lagotis*, тогда как в озерах Франции - на *R. peregra* [Jouet et al., 2009, 2010].

Новый вид *T. sp. var narochanica* инфицирует только один вид моллюска из группы *Radix*, а именно *R. ampla*.

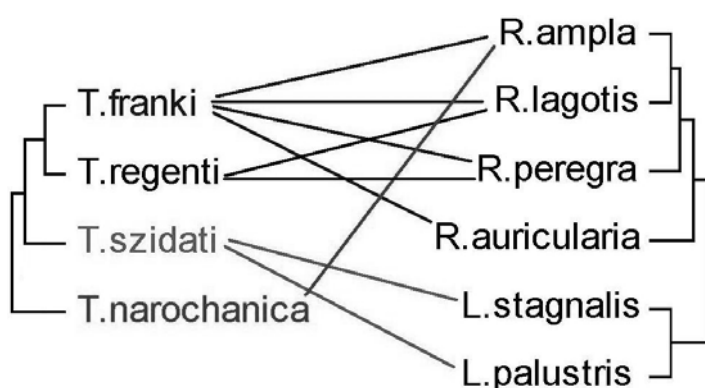


Рис. 9. Гостальная специфичность птичьих шистосом рода *Trichobilharzia*. Слева – реконструкция филогенетических связей между четырьмя видами паразита, справа – между соответствующими видами моллюсков из родов *Radix* и *Lymnaea*, построенная на основании полиморфизма ITS2 рДНК.

Несмотря на неполный охват ареала обитания птичьих шистосом, его ограничением преимущественно европейской частью, мы можем определить в изученной группе основные направления дивергенции предкового генома шистосом рода *Trichobilharzia*.

Вероятно, что наиболее древнюю группу составляют изоляты шистосом *T. franki*, для которых характерно не только удивительно высокое разнообразие митохондриальных генеалогических линий, но и значительный уровень межпопуляционной и индивидуальной варибельности рДНК, а также широкий спектр видов промежуточных хозяев-моллюсков

рода *Radix*. Очевидно, что наряду с процессами гомогенизации линий, между отдельными линиями *T. franki* может происходить обмен генетического материала, приводящий к появлению индивидуальной и популяционной изменчивости генов рДНК. На возможность обмена между отдельными линиями указывают особенности распределения вариантов копий ITS1 рДНК, обнаруженных в географически разобщенных популяциях паразита, например, в Белоруссии и Исландии. Еще одним подтверждением рекомбинационной активности рДНК можно рассматривать присутствие в последовательностях рДНК гипотетических χ -сайтов, способных инициировать межгенную рекомбинацию.

Филогеографическая структура позволяют нам рассматривать группу изолятов, определяемую на основании полиморфных ITS2 рДНК как один вид *T. franki*, в виде более сложного комплекса, состоящего из нескольких (по крайней мере, двух) криптических видов или видов-двойников и, вероятно, нескольких единиц более низкого таксономического ранга. Наиболее близким к группе *T. franki* и, вероятно, более молодым нужно рассматривать назальный вид *T. regenti*, инфицирующий, как и *T. franki*, моллюсков рода *Radix*. Одновременно или несколько позже от предкового генома дивергировала линия шистосом, использующая в качестве промежуточных хозяев моллюсков рода *Lymnaea* и послужившая исходной для формирования генома современных *T. szidati*. Что же касается нового вида *T. sp. var narochanica*, его происхождение и статус пока остаются неопределенными и требуют дополнительной информации о генетической variability и особенностях географического распределения.

ВЫВОДЫ

1. На изученной части ареала наряду с тремя ранее известными в Европе видами птичьих шистосом из рода *Trichobilharzia* (*T. szidati*, *T. regenti*, *T. franki*) показано существование нового вида, названного нами *Trichobilharzia sp. var. narochanica*. Он характеризуется уникальными последовательностями рДНК (28S, ITS1, ITS2) и мт ДНК (*cox1*, *cox3*), а также жесткой приуроченностью к определенному виду хозяина-моллюска (*Radix ampla*).
2. Впервые у птичьих шистосом обнаружена индивидуальная изменчивость рДНК, которая заключается в появлении копий ITS1 рДНК разного размера. Они обнаружены в составе генома у четырех изолятов *T. franki* из Беларуси и связаны с появлением одного дополнительного или редукцией одного из трех основных повторяющихся звеньев, характерных для большинства изолятов этого вида.
3. Для исследованных популяций птичьих шистосом трех видов, *T. szidati*, *T. regenti*, *B. polonica*, характерно отсутствие четко выраженной внутривидовой структуры по ядерным и митохондриальным генам. У видов *T. franki* и *T. sp. var. narochanica* выявлены несколько генеалогических линий, конкордантных по мт гену *cox1*, гену 28S и ITS2 рДНК.
4. Особенности дивергенции митохондриальных и ядерных генов в отдельных популяциях *T. franki* позволяют рассматривать этот вид как сборный, состоящий из нескольких криптических видов с выраженной приуроченностью к разным видам промежуточных хозяев-моллюсков рода *Radix*.
5. Для видов рода *Trichobilharzia* обнаружены несоответствия в топологии дендрограмм, построенных на основании варибельности участков ядерного и митохондриального геномов, вызванные неполной сортировкой предкового полиморфизма и/или возможной интрогрессией геномов в процессе адаптации к моллюскам из родов *Radix* и *Lymnaea*.
6. На основании полиморфизма 28S рДНК разработана молекулярно-генетическая система видовой идентификации четырех видов шистосом рода *Trichobilharzia*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Хрисанфова Г.Г., **Лопаткин А.А.**, Мищенко В.В., Хейдорова Е.Э., Дороженкова Т.Е., Жукова Т.В., Рысков А.П., Семёнова С.К.. Генетическая изменчивость птичьих шистосом (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) озера Нарочь: идентификация нового вида в группе *Trichobilharzia ocellata* ДАН, 2009, 428 (5): 698–702.
2. **Лопаткин А.А.**, Хрисанфова Г.Г., Воронин М.В., Зазорнова О.П., Беэр С.А., Семенова С.К. Полиморфизм гена *cox1* церкариальных изолятов птичьих шистосом (Класс Trematoda, сем. Schistosomatidae), собранных в водоемах Москвы и Московской области. Генетика 2010, том 46 (7): 981-989.
3. Хрисанфова Г.Г., **Лопаткин А.А.**, Шестак А.Г., Мищенко В.А., Жукова Т.В., Акимова Л.Н., Семенова С.К. Полиморфизм гена *cox1* мт ДНК церкариальных изолятов птичьей шистосомы *Bilharziella polonica* (Класс Trematoda: Сем. Schistosomatidae) из водоемов Беларуси. Генетика 2011, том 47 (5): 684-690.

Тезисы конференций:

1. Семенова С.К., **Лопаткин А.А.**, Васильев В.А., Корчагина Е.В., Корсуненко А.В., Хрисанфова Г.Г., Рысков А.П. Филогеномика и молекулярная эволюция на примере дигенетических сосальщиков (класс Trematoda). Международная научная конференция «Вычислительная Филогенетика и Геносистематика». Москва, 16-19 ноября 2007г., с.293-296.
2. Хрисанфова Г.Г., **Лопаткин А.А.**, Васильев В.А., Шестак А.Г., Малинкина Т.Ю., Семенова С.К. «Генетический полиморфизм и видовое разнообразие птичьих шистосом озера Нарочь (республика Беларусь)». IV Всероссийский Съезд Паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения», Санкт-Петербург, Россия, 20 - 25 октября 2008г., С. 202-204.
3. Chrisanfova G., A. Korsunenکو, **A. Lopatkin**, M. Voronin, S. Be'er, O. Zazornova, S. Vodyanitskaya, T. Dorozhenkova, E. Heydorova, V. Mishakov, T. Zhukova, E. Bychkova, S. Semyenova. «Diversity of DNA sequences and species identification of cercariae of bird schistosomes obtained from Russian and Belarusian water ponds». Xth European Multicolloquium of Parasitology. Paris, 24-28 August 2008. pp. 110-111;
4. Chrisanfova G. G., **Lopatkin A. A.**, Vasyliiev V. A., Mischenkov V. V., Zhukova T. V., Voronin M. V., Be'er S. A., Zazornova O. P., Vodyanitskaya S. N., Yurlova N. I., Semyenova S. K. "Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) from cercariae of bird schistosomes ad snail hosts obtained in Ryssian and Belorussian water ponds". 3rd

5. **Lopatkin A. A.**, Chrisanfova G. G., Mischenkov V. V., Zhukova T. V., Ryskov A. P., Semyenova S. K. "Genetic identification and species diversity of bird schistosome cercariae obtained from Narochno lake (Belorussia)". Eighth National Conference of Parasitology (with International Participation), Varna. 23 –26 September 2009., p.13 – 14.
6. Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Васильев В. А., **Лопаткин А. А.**, Корсуненко А. В., Корчагина Е. В., Рысков А. П. «Молекулярная филогения и филогеография паразитических червей – трематод». V съезд Всероссийского общества генетиков и селекционеров. Москва. 25 – 27 июня 2009 г. 21-28 июня 2009, с. 301
7. **A.A. Lopatkin**, G.G. Chrisanfova, V.A. Vasilyev, M.V. Voronin, V.A. Mischenkov, O.P. Zazornova, S.A. Beer, T.V. Zhukova, A.P. Ryskov, S.K. Semyenova. Molecular phylogeny of cercarial isolates of Russian and Belorussian bird schistosomes (Schistosomatidae, Trematoda) and its intermediate snail hosts as inferred the Its2 rDNA sequences. Molecular Phylogenetics: Contributions to the 2nd Moscow International Conference "Molecular Phylogenetics" (Moscow, Russia, May 18-21, 2010). P. 52-53.
8. S. Semyenova, **A. Lopatkin**, E. Kheidorova, V. Vasylyev, M. Voronin, S. Be'er, A. Shestak, S. Vodyanitskaya, N. Yurlova, V. Mischenkov, L. Akimova, O. Zazornova, T. Zhukova, A. Ryskov, G. Chrisanfova. Molecular coevolution of bird schistosomes and ITS intermediate snail hosts. Proceedings of the Seventh International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Systems Biology (Yune 20-27, 2010, Novosibirsk, Russia). P. 257.
9. **Лопаткин А.А.**, Хрисанфова Г.Г., Воронин М.В., Зазорнова О.П., Беер С.А., Водяницкая С.Н., Юрлова Н.И., Рысков А.П., Семенова С.К. Генетическая дифференциация российских изолятов птичьих шистосом рода *Trichobilharzia* на основании последовательностей ядерных и митохондриальных локусов. Материалы Международной научной конференции "Теоретические и практические проблемы паразитологии". Москва, 30 ноября-3 декабря 2010 г. с. 206-210.
10. Васильев В.А., Малинкина Т.Ю., Суходольская Е. М., Водяницкая С. Н., **Лопаткин А. А.**, Рысков А. П., Семёнова С.К. Молекулярная систематика пресноводных моллюсков семейства Lymnaeidae на основании полиморфизма второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) рДНК. Материалы Международной научной конференции "Теоретические и практические проблемы паразитологии". Москва, 30 ноября – 3 декабря 2010 г. Сборник тезисов. С. 81-83.
11. Семенова С.К., Хрисанфова Г.Г., **Лопаткин А.А.**, Мищенко В.В. Жукова Т.А., Рысков А.П., Видовое и генетическое разнообразие церкарий птичьих шистосом (род

12. Хрисанфова Г.Г, Хейдорова Е.Э.,Шестак А.Г., **Лопаткин А.А.**, Бычкова Е.И., Семенова С.К. Генетическая изменчивость птичьих шистосом *Bilharziella polonica* (Trematoda: Schistosomatidae) озера Нарочь: первые данные о популяционной структуре. Материалы Международной научной конференции "Теоретические и практические проблемы паразитологии". Москва, 30 ноября – 3 декабря 2010 г. с. 398-402.