

УДК 575.85'113:575.86:595.132.1

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ПЕТЕЛЬ 35 И 48 МАЛОЙ РРНК СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ, ЧТО Trefusiidae ЯВЛЯЮТСЯ СУБТАКСОНОМ МОРСКИХ Enoplida (Nematoda)

© 2001 г. Л. Ю. Русин, В. В. Алёшин*, Н. С. Владыченская, И. А. Милютина, О. С. Кедрова, Н. Б. Петров

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Поступила в редакцию 22.12.2000 г.

Ген 18S рибосомной РНК морской свободноживущей нематоды *Trefusia zostericola* (Nematoda: Enoplida) имеет редкую нуклеотидную замену на участке, соответствующем эволюционно консервативной петле шпильки 35 рРНК малой субъединицы. Эта же замена свойственна всем остальным морским Enoplida, но не обнаружена у каких-либо иных нематод. Эта молекулярная синапоморфия указывает на более тесное родство морских Enoplida с *T. zostericola*, нежели с пресноводными Triplochida. Анализ полных последовательностей гена методами MP, NJ, ML, в том числе с учетом гетерогенности нуклеотидных позиций по скоростям эволюции, поддерживает это заключение. Таким образом отвергается гипотеза об особенной примитивности Trefusiidae среди нематод. Молекулярные методы реконструкции филогении оказываются критерием обоснования морфологической редукции метанем в эволюции Trefusiidae. Наряду с петлей шпильки 35, у Enoplida (включая *T. zostericola*) изменена петля 48, причем редкая трансверсия в петле 48 гомопластична таковой у нематод Mesorhabditoidea (в составе родственных родов *Pelodera*, *Mesorhabditis*, *Teratorhabditis*, *Parasitorhabditis*, *Crustorhabditis*, *Distolabrellus*) и у 11 порядков Rhodophyta. Редкие мутации в петлях 35 и 48 имеют тенденцию фиксироваться скоррелированно в эволюции и свойственны, например, всем Acanthocephala, а по результатам рентгено-структурного анализа эти участки (H31 и H43 по альтернативной номенклатуре) топографически сближены в нативной рибосоме. Обсуждается природа и распространенность на филогенетическом дереве молекулярных аутапоморфий таксонов высокого ранга.

Ключевые слова: 18S рРНК, молекулярная филогения, Nematoda, Adenophorea, Enoplida, Trefusiidae, артефакт притяжения длинных ветвей (LBA).

Полное секвенирование генома круглого червя *Caenorhabditis elegans* вывело его в число наиболее изученных молекулярными методами организмов, с которым теперь, в первую очередь, будут сравнивать гены других многоклеточных животных. Помимо того, нематода *C. elegans* – один из модельных объектов эмбриологии: интенсивно изучается влияние мутаций конкретных генов на взаимодействие и запрограммированную гибель клеток в эмбриогенезе, на развитие нервной системы и другие аспекты. Чтобы понять, какие свойства являются специфичными для *C. elegans*, какие свойственны близким видам, а какие характерны для многих типов животных, необходимо исследовать таксоны, находящиеся в разной степени родства с *C. elegans*, особенно – внутри типа круглых червей (Nematoda) [1]. Развернуты широкомасштабные программы по определению последовательностей ДНК [2] у имеющих медицинское значение паразитических видов *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Ancylostoma caninum*, у фито-

паразитической нематоды *Meloidogyne incognita*, у свободноживущей нематоды *Pristionchus pacificus*, по каждому из которых в базе GenBank уже содержится по несколько тысяч или десятков тысяч документов. Сведения о филогенетических отношениях таксонов нематод могли бы быть полезными при выборе объектов по определению нуклеотидных последовательностей. Особый интерес представляют свободноживущие морские нематоды отряда Enoplida. На основании анализа морфологических признаков выдвинута гипотеза, что Enoplida – это наиболее примитивные формы в типе Nematoda [3, 4]. Кладистический анализ привел к вычленению из состава Enoplida парафилетического остатка, выделенного Лоренцем в отряд Trefusiida [5]. В нем не удалось обнаружить синапоморфий при рассмотрении анатомии и тонкого строения [5], поэтому в свете кладистического анализа они предстают в виде самых примитивных нематод. Ранее предполагали, что Trefusiidae близки к основанию эволюционного дерева нематод [6–8]. Подобное мнение основывается на отсутствии в строении Trefusi-

*Эл. почта: petr@bioevol.genebee.msu.su

idae выраженных черт морфологической специализации.

Мы решили проверить гипотезу о предковом положении Trefusiidae, используя молекулярные признаки. Ниже приведены данные по молекулярным синапоморфиям *Trefusia zostericola* (представителя типового рода семейства Trefusiidae) и Enoplida, что опровергает гипотезу об особенной примитивности Trefusiidae.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

ДНК выделяли из фиксированных в этаноле особей *Trefusia zostericola*, собранных на Беломорской станции МГУ (Кандалакшский залив Белого моря). Фрагменты генов генов 18S рибосомной РНК (рРНК) амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием праймеров для опубликованной ранее структуры [9]. Фрагменты ДНК нужного размера очищали с помощью гель-электрофореза и клонировали в векторе pBluescript KS⁺ (Stratagene), линеризованный по сайту *EcoRV*. Последовательности по обеим цепям определяли с помощью набора *fmol* DNA Sequencing System ("Promega") с использованием универсальных праймеров к векторной части плазмид и набора внутренних праймеров, комплементарных консервативным участкам гена. Суммарная последовательность (AF329937 в GenBank) представляет собой консенсус из четырех полностью и двух частично секвенированных клонов. Номера последовательностей, взятых из GenBank для филогенетического анализа, приведены на рисунках. Последовательности выравнивали вручную с учетом принятой модели вторичной структуры 18S рРНК [10]; эти данные доступны в электронной форме по запросу petr@bioevol.genebee.msu.su. При анализе использованы полные последовательности, за исключением гипервариабельной области V9 (апикальная часть шпильки 49). Для построения филогенетических деревьев применяли методы максимальной экономии (MP), связывания ближайших соседей (NJ) (пакет PHYLIP [11]) и максимального правдоподобия (ML) (fastDNAm1, version 1.2.2 [12]). Статистическую надежность узлов оценивали с использованием бутстрэп-анализа [13] (по 1000 псевдореплик для деревьев (MP и NJ и 20 – для ML). Для дерева ML использовали и альтернативный способ оценки достоверности, при котором учитывали множество субоптимальных деревьев, достоверно не отличающихся от минимального дерева по критерию Кишины-Хасегавы [14]. При построении деревьев с учетом различий в эволюционной скорости замещения по сайтам параметры гамма-распределения вычисляли с помощью программы PUZZLE 4.0 [15], используя модель TN [16] с шестью категориями позиций, различающихся по скорости замещений. Эти же

программу и модель использовали при проведении четырехкластерного картирования [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованный набор включены представители всех основных линий нематод, последовательности гена 18S рРНК которых представлены в базе GenBank, причем выборка из Enoplida является исчерпывающей на настоящее время. В качестве внешних групп использовали последовательности первичнополостных (нематоморф, приапулид, гастротрих, коловраток) и заведомо более отдаленных групп – аннелид и книдарий.

Все использованные методы построения деревьев принципиально сходным образом расчлениают множество нематод на четыре основные группы (рис. 1). Не изменяется этот результат также и при введении поправки на разную эволюционную скорость нуклеотидных замещений по сайтам (рис. 1). Надежную статистическую поддержку имеют следующие крупнейшие клады: (1) Chromadoria (включающая Rhabditia (=Secernentea), отряды Plectida, Monhysterida, Desmodorida, Chromadorida и некоторые другие, не использованные в настоящем сравнении); (2) Dorylaimia (включающая отряды Dorylaimida, Mononchida, Mermithida, Trichinellida); (3) Triplonchida (включающая Tobilina и Diptherophorina); (4) Enoplida (включающая морских представителей отряда). Состав этих группировок не может считаться традиционным, однако именно эти группировки были обнаружены и описаны при молекулярных исследованиях другими авторами филогении типа [18, 19]. Последовательность гена 18S рРНК *Trefusia zostericola* включается в кластер с прочими морскими Enoplida с высокой статистической поддержкой на всех деревьях, за исключением деревьев MP и NJ, построенных без учета гетерогенности скорости эволюции по сайтам (рис. 1).

Для проверки надежности включения *Trefusia zostericola* в группировку Enoplida использовали филогенетическое картирование методом максимального правдоподобия [17]. Тот же набор видов, что и для построения деревьев (за исключением внешних групп), был разбит на четыре группы (Enoplida, Triplonchida, Dorylaimia и Chromadoria), соответствующие монофилетическим кладам на дереве (рис. 1). В качестве пятой группы был взят вид *T. zostericola*, положение которого на дереве необходимо было подтвердить. Для каждой из пяти возможных четверок таксонов была определена поддержка каждой из трех возможных топологий с использованием модели TN с поправкой на гетерогенность позиций по скорости эволюции. Результаты анализа приведены в таблице, из которой видно, что наибольшую поддержку во всех случаях получают топологии, объединяющие *T. zostericola* с Enoplida: 67.7, 66.3 и 62.8% в разных

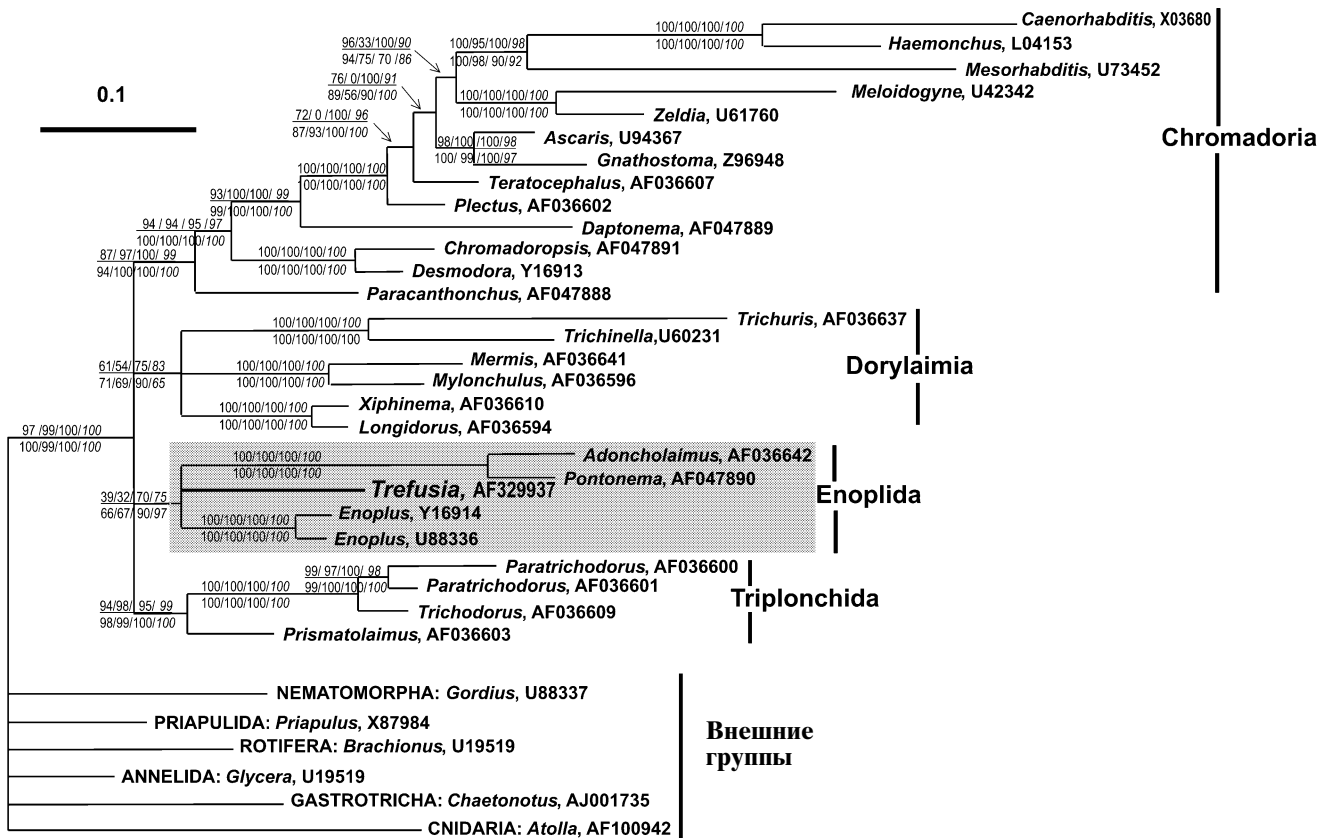


Рис. 1. Положение *Trefusia zostericola* на филогенетическом дереве нематод.

Узлы, зависящие от способа построения дерева или имеющие недостаточную статистическую поддержку, сведены в один. Длины ветвей рассчитаны по принципу максимального правдоподобия с использованием программы PUZZLE с поправкой на гетерогенность скорости эволюции по сайтам на основе гамма-распределения с шестью категориями скорости замещений, модель TN. Числа при узлах (в порядке слева направо) означают процент бутстрэп-поддержки узла в консенсусном дереве для максимально экономных, дистанционных NJ, и максимально правдоподобных деревьев (из 1000, 1000 и 20 псевдореплик соответственно). Курсивом выделена процентная частота группировки в наборе субоптимальных деревьев ML, не отличающихся достоверно от оптимального дерева по критерию Кишино-Хасегава. Набор составлял 287 деревьев из 17560 просмотренных деревьев различной топологии при анализе невзвешенных данных и 72 дерева из 6234, просмотренных при поправке на гетерогенность сайтов по скорости изменений. Выше черты приведены индексы поддержки групп, полученные без поправки на гетерогенность скорости изменений, ниже черты – с использованием поправки.

комбинациях четверок таксонов. Все альтернативные способы объединения *T. zostericola* получили намного меньшую поддержку.

Программа dnparars (пакет PHYLIP) позволяет выводить пошаговые изменения последовательностей, требующиеся для каждого узла максимально экономного дерева, построенного программой. В выведенном массиве предполагаемых апоморфий Enoplida (включая *Trefusia zostericola* и исключая Triplonchida) содержится 55 признаков. Сравнение соответствующих участков на расширенной выборке последовательностей 18S рРНК показывает, что 53 из них относятся к эволюционно вариабельным областям гена. Для 43 признаков вариации имеются даже среди 5 включенных в анализ последовательностей морских Enoplida, то есть в их эволюции происходили не-

однократно фиксации нуклеотидных замен по этим сайтам. Для 11 признаков, единообразных у 5 видов Enoplida, гомопластичные замены встречаются среди известных последовательностей других нематод с различной частотой. Наконец, единственная транзигция A → G (остаток 1195 по последовательности *Enoplus brevis*) приходится на консервативную область гена, среди нематод она свойственна только Enoplida (исключая Triplonchida) и обнаруживается у всех исследованных видов (рис. 2).

Характерная для эноплид транзигция локализуется в одноцепочечной петле шпильки 35 рРНК (рис. 2). Первичная структура этой петли высоко консервативна не только среди нематод, но и у всех многоклеточных животных. Например, в выборке из 880 выровненных последовательностей

Анализ положения *Trefusia* с помощью картирования методом максимального правдоподобия

Комбинации из 4 таксонов ^а	Альтернативные топологии ^б	Поддержка ^в
I <i>Tref, Enop, Dory, Trip</i>	(<i>Tref, Enop</i>), (<i>Dory, Trip</i>)	67.7
	(<i>Tref, Dory</i>), (<i>Enop, Trip</i>)	18.8
	(<i>Tref, Trip</i>), (<i>Enop, Dory</i>)	13.5
II <i>Tref, Trip, Dory, Chro</i>	(<i>Tref, Trip</i>) (<i>Dory, Chro</i>)	23.7
	(<i>Tref, Dory</i>) (<i>Trip, Chro</i>)	33.5
	(<i>Tref, Chro</i>) (<i>Trip, Dory</i>)	42.8
III <i>Tref, Enop, Trip, Chro</i>	(<i>Tref, Enop</i>) (<i>Trip, Chro</i>)	66.3
	(<i>Tref, Enop</i>) (<i>Trip, Chro</i>)	66.3
	(<i>Tref, Trip</i>) (<i>Enop, Chro</i>)	1.0
IV <i>Tref, Enop, Dory, Chro</i>	(<i>Tref, Chro</i>) (<i>Enop, Trip</i>)	32.7
	(<i>Tref, Enop</i>) (<i>Dory, Chro</i>)	62.8
	(<i>Tref, Dory</i>) (<i>Enop, Chro</i>)	8.5
V <i>Enop, Trip, Dory, Chro</i>	(<i>Tref, Chro</i>) (<i>Enop, Trip</i>)	17.5
	(<i>Enop, Trip</i>) (<i>Dory, Chro</i>)	51.6
	(<i>Enop, Dory</i>) (<i>Trip, Chro</i>)	31.8
	(<i>Enop, Chro</i>) (<i>Dory, Trip</i>)	16.6

^а *Tref* – *Trefusia*; *Enop* – *Enoplida*; *Trip* – *Triplonchida*; *Dory* – *Dorylaimia*; *Chro* – *Chromadoria*.

^б Тройки альтернативных топологий бескорневого дерева, возможные для четырех таксонов.

^в Процентная доля всех возможных квартетов, поддерживающая данную топологию.

тей 18S рРНК Metazoa [10] (<http://trna.uia.ac.be/ssu>) имеются следы только трех зафиксированных транзаций в соответствующем положении за пределами *Enoplida*: такой же остаток G имеется у сверчка *Acheta domesticus* (номер в GenBank X95741), в одной последовательности дициемид (из трех известных) и во всех без исключения из 21 известных последовательностей 18S рРНК скребней (тип *Acanthocephala*), представляющих все три класса этого типа. При поиске с использованием программы BLAST [20] в базе GenBank и просмотре собственной выборки выровненных последовательностей 18S рРНК многоклеточных животных обнаружили еще два случая аналогичной транзации – у жука *Trypodendron lineatum* (номер в GenBank AF250076) и аберрантной микоспоридии РКХ 52134 (номер U79623). За пределами Metazoa эта транзация также редка во многих группах: например, в антверпенской базе данных [10] среди выровненных 1040 последовательностей рРНК грибов она отмечена у единственного вида, среди 301 последовательности Alveolata – у един-

ственного вида, среди 211 красных водорослей и среди 122 разножгутиковых не встречается ни разу и т.д.

На рис. 2 на фрагменте выравнивания кроме синапоморфии *Enoplida* в петле 35 приведено 8 других “апоморфий”, учитываемых программой *dnpars*. Как легко видеть, большинство их локализовано в вариабельных сайтах, многократно изменявших свое состояние в пределах рассматриваемых групп. По-другому выглядит трансверсия G → T в участке, соответствующем петле шпильки 48 (остаток 1601 по последовательности *Enoplus brevis*). Это эволюционно консервативный участок, подобный участку шпильки 35. Только два таксона нематод, *Enoplida* и рабдитидные нематоды группы *Mesorhabditoidea*, приобрели тимидиновый остаток в соответствующем положении петли 48, причем он характерен почти для всех изученных видов таксона. Для *Mesorhabditoidea* это виды родов *Pelodera*, *Mesorhabditis*, *Teratorhabditis*, *Parasitorhabditis*, *Crustorhabditis*, *Distolabrellus* – всего 15 последовательностей, учитываемая опубликованные [21–23], представленные в базе GenBank и на персональном сайте Д. Фитча (<http://www.nyu.edu/projects/fitch/fre-search/fsystemat/fsystemat.html>). Исключения ограничены двумя неопубликованными последовательностями *Pelodera* (из шести известных). Таким образом, несмотря на очевидную гомоплазию *Enoplida* и *Mesorhabditoidea* по этому признаку, он вполне пригоден для них в качестве филогенетического маркера, отделяющего их от близких клад.

Проверка распространенности трансверсии G → T в петле шпильки 48 за пределами нематод показала, что она встречается относительно редко. Например, в упоминавшейся антверпенской выборке [10] из 1040 последовательностей грибов такое событие отмечено один раз, из 122 разножгутиковых – ни разу, из 860 зеленых растений – у семи видов, принадлежащих к зеленым водорослям, четыре из которых относятся к ульвовым, и т.д. Кажущееся исключение на этом фоне представляют *Rhodophyta*, где тимидиновый остаток в соответствующем положении встречается весьма часто – в 131 случае из 211. Однако дифференцированный учет распределения этого признака среди *Rhodophyta* показывает, что у представителей класса *Vangiophyceae* и в 7 порядках *Florideophyceae* сохраняется плезиоморфное состояние, у представителей же 11 порядков *Florideophyceae* этот признак апоморфный и может быть следствием единственного эволюционного события. Среди Metazoa трансверсия G → Y имеется у стеклянной губки, двух видов гидроидных, двух ветвистосых, одного вида ракушковых и одного вида десятиногих ракообразных, а также у двух неродственных видов турбеллярий, одного вида белокрылки, сверчка *Acheta domesticus*, микоспоридии РКХ 52134 и у всех *Acanthocephala* без ис-

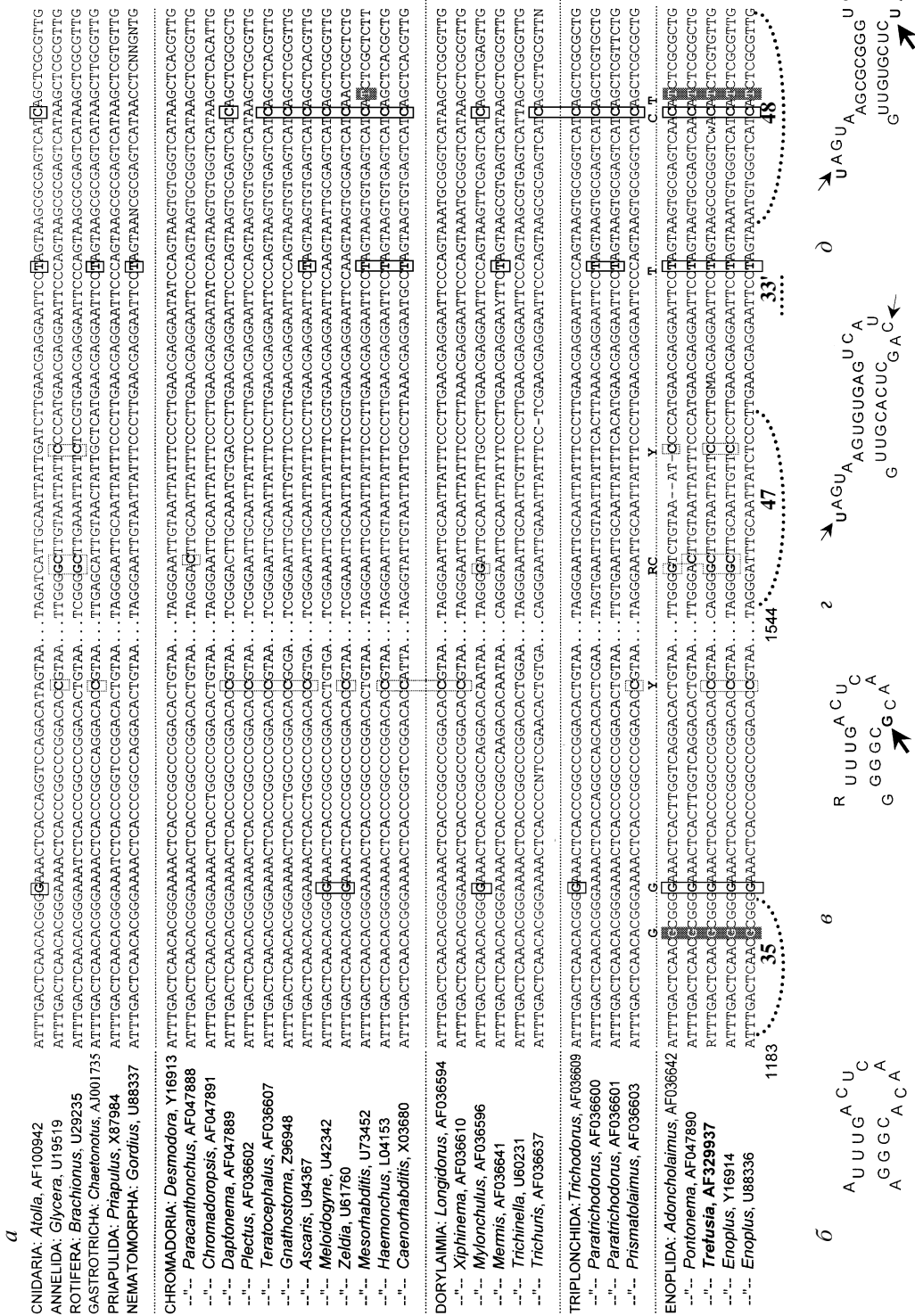


Рис. 2. Локализация синаноморфных признаков в 18S рРНК морских Еноридеи. *а* – фрагменты выровненных последовательностей гена, соответствующие областям спиралей 35 и 48 в 18S рРНК; пунктирные линии отделяют четыре надежно установленные клады нематод (см. в тексте); на нижней пунктирной линии отмечены предположительные синаноморфии *Trefusia zostericola* и других морских Еноридеи, как выделено программой *dnalip*. Одинаковые остатки в отмеченных высоко вариабельных сайтах объединены пунктирными рамками, в более консервативных – сплошными рамками, а в высоко консервативных сайтах даны на темном фоне; пунктирными дугами и полужирным шрифтом отмечены канонические участки двойных спиралей в рРНК. Приведены только родовые названия видов с указанием номера последовательности в базе GenBank; нумерация нуклеотидов приведена по последовательности *E. brevis*; *б* – модель вторичной структуры спиральки 35 *Caenorhabditis elegans*; *в* – то же *T. zostericola*; *г* – модель вторичной структуры спиральки 48 *E. elegans*; *д* – *T. zostericola*.

ключения. В последних трех таксонах, как и у Enoplida, также фиксирована транзиция A → G в петле шпильки 35. Таким образом, проявляется определенная тенденция к согласованному изменению в петлях шпилек 35 и 48, хотя эта корреляция далеко не абсолютна.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимоотношение четырех наиболее крупных клад нематод (Enoplida, Triplonchida, Dorylaimia, Chromadoria) довольно неопределенно. Эти четыре таксона способны образовать корневые деревья 15-ти топологий, и многие из них реализуются при использовании различных способов построения деревьев. Наибольшую бутстрэп поддержку, в зависимости от способа построения, получают альтернативные варианты начальной бифуркации (не показано). В связи с этим включение последовательности гена 18S рРНК *Trefusia zostericola* в состав одного из кластеров еще не позволило бы с достаточной уверенностью отвергнуть гипотезу предкового положения Trefusiidae. Разные линии нематод сильно отличаются по скорости эволюции гена 18S рРНК. Очень сильно дивергировали от “типичной” последовательности многих рабдитидных нематод, например, ген 18S рРНК *Pelodera strongyloides* – один из наиболее уклонившихся не только среди животных, но и всех эвкариот в целом [21]. В некоторых таксонах нематод высокого ранга (Trichinellida, Trichodoridae, Oncholaimidae) вообще не найдены последовательности гена 18S рРНК, мало отличающихся от “типичной”. Известно, что последовательности, накопившие очень много замен, неверно размещаются на дереве даже теми традиционно используемыми филогенетическими программами, алгоритмы которых формально не основаны на гипотезе молекулярных часов [24–26]. Отражением этого является факт “недоверности” бутстрэп-поддержки для группировки *Trefusia* + Enoplida на MP и NJ деревьях, полученных без поправки на гетерогенность по сайтам. Для нематод ранее было экспериментально показано, что результаты построения дерева зависят от выбора видов [27–28]. Без кладистического анализа отдельных молекулярных признаков трудно было бы доказать, что группировка *Trefusia zostericola* с Enoplida – не артефакт применения компьютерных программ, основанных на методе ML или коррекции на основе гамма-распределения. Естественность группировка *Trefusia* + Enoplida особенно убедительно подтверждается наличием у них синапоморфии в петле шпильки 35, по которой остальные нематоды плезиоморфны (рис. 2). Апоморфность морских Enoplida, то есть направление эволюции в указанном фрагменте гена, однозначно выводится при использовании обширной выборки “внешних групп” – животных других

типов и одноклеточных эвкариот. Оценивая вероятность обсуждаемых замен в петлях 35 и 48 приблизительно в 10^{-2} каждую в соответствии с их частотами в анализированных выборках, получаем вероятность независимого возникновения у *Trefusia zostericola* двух “эноплидных” признаков равной 10^{-4} , поэтому вряд ли такое событие может быть случайно обнаружено в выборке из 2×10^2 известных последовательностей 18S рРНК Nematoda. В то же время в классическом NJ-анализе без поправки на гетерогенность сайтов по скорости эволюции 68% реплик бутстрэпа не поддерживают группировку *Trefusia* + Enoplida. Таким образом, кладистический анализ, хотя и согласуется с традиционным сравнением полных последовательностей гена, оказывается даже более надежным свидетельством монофилии Trefusiidae и остальных морских Enoplida. Гипотеза предкового положения Trefusiidae среди нематод на этом основании отвергается.

Возникает вопрос, насколько полученный филогенетический результат можно распространить на всех тrefузиид. Это следовало бы сделать при наличии ясных свидетельств их монофилетичности. Лоренцен [5] объединил в отряд Trefusiida пять семейств нематод: Trefusiidae, Simpliconematidae, Laurathonematidae, Xenellidae и Onchulidae, которые сильно отличаются между собой, но сходны по “негативному” признаку: в этих семействах не были обнаружены метанемы – специфические субкутикулярные проприорецепторы, свойственные другим Enoplida. Полученный филогенетический результат, свидетельствующий о более тесном родстве морских Enoplidae с *Trefusia zostericola*, нежели с пресноводными Tobrilidae, позволяет ревизовать представления об эволюции метанем. Поскольку метанемы имеются у Enoplidae и некоторых Tobrilidae (Triplonchida) [5], они должны были бы присутствовать в общем предке этих групп ([5], с. 75). Следовательно, отсутствие метанем у Trefusiidae объясняется их редукцией. Это очевидный пример, когда простота группы, считавшейся ранее пресковой, обусловлена частичной морфологической редукцией. Следовательно, отсутствие метанем – это синапоморфия Trefusiida, а не симплезиоморфия, как полагал Лоренцен. Однако невозможно полностью исключить, что они редуцировали независимо, так же как и то, что у некоторых видов таких малоклеточные структуры как метанемы обнаружить трудно. По этой причине вопрос о филогенетическом положении остальных семейств Trefusiida должен рассматриваться особо, и сведения о первичной структуре петли 35 у их представителей могут быть полезны для его решения.

Также преждевременно (на основании молекулярных данных) обсуждать вопрос о положении семейства Trefusiidae внутри Enoplida. Отношение Trefusiidae, Enoplidae, Oncholaimidae представлено

на рис. 1 как неразрешенная трифуркация, поскольку размещение *Trefusia zostericola* на дереве 18S рРНК зависит от алгоритма построения дерева и может сильно искажаться из-за больших генетических расстояний, ведущих к Oncholamidae. Однако, вывод о вторичности признака – отсутствия метанем у Trefusiidae позволяет теперь с большим основанием искать их родственников среди семейств Enoplida, имеющих метанемы, как, например, Трупиллоидиды, родство с которыми предполагалось ранее на основе сходства в форме головных сенсилл внутреннего круга у некоторых видов Trefusiidae и Трупиллоидиды [29].

Сложнее, чем эволюцию метанем, интерпретировать значение высококонсервативных замен в шпильках 35 и 48 морских Enoplida. Как и во многих подобных случаях использования филогенетических молекулярных маркеров, здесь можно предполагать, что соответствующие остатки вовлечены во взаимодействия в нативной рибосоме с лигандом [30]. Петля шпильки 35 (по альтернативной номенклатуре ей присвоен номер 31) имеет важное функциональное значение и входит в состав Р-сайта рибосом [31]. При рентгеноструктурном анализе 30S рибосомных частиц бактерии *Thermus thermophilus* с разрешением в 3 Å обнаруживается топографическая близость шпилек 35 и 48 (или 31 и 43 по альтернативной нумерации) в нативной 30S субчастице [32], хотя последняя шпилька не включается в состав Р-сайта [31]. Рентгеноструктурный анализ позволил идентифицировать по крайней мере один белок – S9, который связывается с РНК обеих гомологичных шпилек этих бактерий [32]. Какие остатки каких молекул выступают лигандами G1195 и U1601 у *Enoplus brevis* и других Enoplida и почему эти остатки рРНК заменили предковые А и Г, в настоящее время остается неизвестным. Однако редкое появление изменений в соответствующих позициях и длительная эволюционная стабильность изменения, если его все-таки удастся зафиксировать (например, на протяжении эволюции всех Enoplida или целого типа Acanthocephala), с определенностью свидетельствуют, что такие изменения требуют одновременных компенсаторных изменений лиганда и поэтому эволюционируют в режиме “прерываемого равновесия” [33–34]. Также пока остается непонятным, почему согласованы переходы в шпильках 35 и 48. Причина не может быть связана с непосредственным коплементарным взаимодействием этих остатков и не является строгой. Относительно более редкой транзиции А → Г в петле 35 можно сказать, что только примерно в половине случаев наблюдается фиксация трансверсии Г → У в шпильке 48. Однако, оставаясь функционально не охарактеризованными, апоморфные замены в петлях шпилек 35 и 48 являются хорошими маркерами для распознавания принадлежащих морским Enopli-

да новых последовательностей генов 18S рРНК. Эти маркеры позволяют избежать ошибок, вызванных искусственным кластерированием “длинных ветвей”. То же относится к петле шпильки 48, характерной для Mesorhabditoidea. Указанные нуклеотиды могут быть мишенями для специфических праймеров в этих группах нематод.

Авторы благодарны В.В. Малахову и А.В. Чесунову за полезные советы и замечания, а также за помощь в проведении работы на Белом море. Настоящее исследование получило финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (99-04-48840, 00-15-97905 и 01-04-48832) и Министерства образования РФ (проект по фундаментальному естествознанию – направление “Биология”, 97-10-140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blaxter M.L. // Science. 1998. V. 282. P. 2041–2046.
2. Johnston D.A., Blaxter M.L., Degraeve W.M., Foster J., Ivens A.C., Melville S.E. // BioEssays. 1999. V. 21. P. 131–147.
3. Малахов В.В., Рыжиков К.М., Сонин М.Д. // Зоол. журн. 1982. Т. 62. С. 1128–1134.
4. Малахов В.В. // Нематоды. Строение, развитие, система и филогения. М.: Наука. 1986.
5. Lorenzen S. // The phylogenetic systematics of freeliving nematodes. London: The Ray Society. 1994.
6. Gerlach S. // Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. 1966. H. 118. S. 25–38.
7. Riemann F. // Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Beemerhaven. 1966. X. S. 1–30.
8. Гайдашова С. В. Исследование по морфологии и таксономии свободноживущих нематод сем. Trefusiidae (Enoplida) / Дипломная работа. Московский государственный университет. Москва, 1992. С. 130.
9. Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. // Gene. 1988. V. 71. P. 491–499.
10. Van de Peer Y, De Rijk P, Wuyts J, Winkelmans T, De Wachter R. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 175–176.
11. Felsenstein J. // PHYLIP – Phylogeny Inference Package, version 3.5. Seattle: University of Washington. 1993.
12. Olsen G.J., Matsuda H., Hagstrom R., Overbeek R. // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 41–48.
13. Felsenstein J. // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791
14. Kishino H., Hasegawa M. // J. Mol. Evol. 1989. V. 29. P. 170–179.
15. Strimmer K., von Haeseler A. // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. P. 964–969.
16. Tamura K., Nei M. // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512–526.
17. Strimmer K., von Haeseler A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6815–6819.
18. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. // Nature. 1998. V. 392. P. 71–75.

19. *De Ley P., Blaxter M.L.* // The biology of nematodes / Ed. Lee D. 2000. P. 1–30.
20. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
21. *Fitch D.H.A., Bugaj-Gaweda B., Emmons S.W.* // Mol. Biol. Evol. 1995. V. 12. P. 346–358.
22. *Fitch D.H.A.* // J. Nematol. 2000. V. 32. P. 235–244.
23. *Sudhaus W., Fitch D.H.A.* // J. Nematol. 2001. V. 33. P. 1.
24. *Felsenstein J.* // Systematic Zoology. 1978. V. 27. P. 401–410.
25. *Hillis D.M., Huelsenbeck J.P., Swofford D.L.* // Nature. 1994. V. 369. P. 363–364.
26. *Philippe H., Germot A.* // Mol Biol Evol. 2000. V. 17. P. 830–834.
27. *Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A., Lake J.A.* // Nature. 1997. V. 387. P. 489–493.
28. *Aleshin V.V., Milyutina I.A., Kedrova O.S., Vladychenskaya N.S., Petrov N.B.* // J. Mol. Evol. 1998. V. 47. P. 597–605.
29. *Vincx M., Furstenberg J.P.* // Sygologia. 1988. V. 4. P. 10–16.
30. *Gutell R.R., Noller H.F., Woese C.R.* // EMBO J. 1986. V. 5. P. 1111–1113.
31. *Carter A.P., Clemons W.M., Brodersen D.E., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V.* // Nature. 2000. V. 407. P. 340–348.
32. *Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr, Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonnrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V.* // Nature. 2000. V. 407. P. 327–339.
33. *Eldredge N., Gould S.J.* // Models in Paleobiology / Ed. Schopf T.J.M. San Francisco: Cooper and Co. 1972. P. 82–115.
34. *Алëшин В.В., Владыченская Н.С., Кедрова О.С., Миллютина И.А., Петров Н.Б.* // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. С. 319–329.