

УДК 575.852'113+595.188

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ ГАСТРОТРИХ НА ОСНОВЕ СРАВНЕНИЯ ГЕНОВ 18S рРНК: ОТКАЗ ОТ ГИПОТЕЗЫ РОДСТВА С НЕМАТОДАМИ

© 2007 г. Н. Б. Петров<sup>1\*</sup>, А. Н. Пегова<sup>2</sup>, О. Г. Манылов<sup>3</sup>, Н. С. Владыченская<sup>1</sup>,  
Н. С. Мюге<sup>4</sup>, В. В. Алешин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва

<sup>2</sup>Международный биотехнологический центр Московского государственного  
университета им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва

<sup>3</sup>Кафедра зоологии беспозвоночных Санкт-Петербургского государственного университета,  
199034 Санкт-Петербург

<sup>4</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, 119991 Москва

Поступила в редакцию 15.08.2006 г.

Принята к печати 05.09.2006 г.

Гастротрихи, мелкие, преимущественно мейобентосные ацеломические животные, филогенетические связи которых с другими группами беспозвоночных и между собой остаются неясными, несмотря на попытки разрешить их с помощью анализа как морфологических, так и молекулярных данных. С целью проверки разных гипотез о родственных связях этой группы и выяснения причин противоречий в результатах предыдущих работ мы провели анализ полных последовательностей генов 18S рРНК 15 видов гастротрих (8 новых и 7 опубликованных ранее). Результаты использования метода максимального правдоподобия и байесовского анализа показывают, что гастротрихи образуют монофилетическую группу в составе клады Spiralia, объединяющей Gnathostomulida, Plathelminthes, Syndermata (Rotifera + Acanthocephala), Nemertea and Lophotrochozoa. Статистические тесты отвергают гипотезы, рассматривающие гастротрих как ближайших родственников Nematoda и других Ecdysozoa или помещающие их в основание дерева Bilateria вблизи Acoela или Nemertodermatida. Внутри гастротрих виды отрядов Macrodasysiida и Chaetonotida образуют две хорошо поддерживаемые клады. Подтверждена монофилия семейств Chaetonotidae и Xenotrichulidae (отр. Chaetonida), а также семейств Turbanellidae и Thaumastodermatidae (отр. Macrodasysida). Семейство Lepidodasyidae полифилетично, потому что *Mesodasys* образует сестринскую линию к Turbanellidae, *Cephalodasys* образует отдельную линию в основании Macrodasysida, а *Lepidodasys* группируется с *Neodasys* между Thaumastodermatidae и Turbanellidae. Для подтверждения этих выводов и получения более точных представлений о филогении гастротрих необходимо в будущем исследовать большее число видов, а также включить в анализ другие гены.

**Ключевые слова:** 18S рРНК, молекулярная филогения, Bilateria, Protostomia, Spiralia, Ecdysozoa, Gastrotricha, Gnathostomulida, Nematoda.

MOLECULAR PHYLOGENY OF GASTROTRICHA ON THE BASE OF 18S rRNA GENES COMPARISON: REJECTION OF HYPOTHESIS OF RELATEDNESS WITH NEMATODES, by N. B. Petrov<sup>1\*</sup>, A. N. Pegova<sup>2</sup>, O. G. Manylov<sup>3</sup>, N. S. Vladychenskaya<sup>1</sup>, N. S. Muge<sup>4</sup>, V. V. Aleshin<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia, \*e-mail: Petr@belozersky.msu.ru; <sup>2</sup>International Center of Biotechnology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia; <sup>3</sup>Chair of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia; <sup>4</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Gastrotrichs are meiobenthic free-living aquatic worms whose phylogenetic and intra-group relationships remain unclear despite some attempts to resolve them on the base of morphology or molecules. In this study we analysed complete sequences of the 18S rRNA gene of 15 taxa (8 new and 7 published) to test numerous hypotheses on gastrotrich phylogeny and to verify whether controversial interrelationships from previous molecular data could be due to the short region available for analysis and the poor taxa sampling. Data were analysed using both

Принятые сокращения: ML – максимальное правдоподобие; BA – байесовский анализ; ПВ – постериорная вероятность.  
\*Эл. почта: Petr@belozersky.msu.ru

maximum likelihood and Bayesian inference. Results obtained suggest that gastrotrichs, together with Gnathostomulida, Plathelminthes, Syndermata (Rotifera + Acanthocephala), Nemertea and Lophotrochozoa, comprise a clade Spiralia. Statistical tests reject phylogenetic hypotheses regarding Gastrotricha as close relatives of Nematoda and other Ecdysozoa or placing them at the base of bilaterian tree close to acoels and nemertodermatides. Within Gastrotricha, Chaetonotida and Macrodasysida comprise two well supported clades. Our analysis confirmed the monophyly of the Chaetonotidae and Xenotrichulidae within Chaetonotida as well as Turbanellidae and Thaumastodermatidae within Macrodasysida. *Mesodasys* is a sister group of the Turbanellidae, and Lepidodasyidae appears to be a polyphyletic group as *Cephalodasys* forms a separate lineage at the base of macrodasysids, whereas *Lepidodasys* groups with *Neodasys* between Thaumastodermatidae and Turbanellidae. To infer a more reliable Gastrotricha phylogeny many species and additional genes should be involved in future analyses.

*Key words:* 18S rRNA, 28S rRNA, molecular phylogeny, Bilateria, Protostomia, Spiralia, Ecdysozoa, Gastrotricha, Gnathostomulida, Nematoda.

Гастротрихи – мелкие, преимущественно мейобентосные ацеломические животные – составляют одну из небольших групп беспозвоночных, которую, в ранге класса или типа, традиционно рассматривали в составе псевдоцеломат, или асгельминтов [1–3]. Филогенетические связи гастротрих остаются неясными. Исходно их сближали либо с коловратками, либо с нематодами [2]. Последующий кладистический анализ морфологических признаков дал основание предположить, что гастротрихи занимают более базальное положение на филогенетическом древе билатерально-симметричных многоклеточных животных (Bilateria) [4]. Гастротрих рассматривали также в качестве сестринской группы Introverta (Nematoda + Nematomorpha + Priapulida + Kinorhyncha + Loricifera) [5, 6] или сестринской группы Ecdysozoa (Introverta + Panarthropoda) [7, 8]; их сближали с плоскими червями и гнатиферами (Gnathostomulida + Syndermata) [9] или объединяли вместе с гнатостомулидами, плоскими червями и коловратками в группировку Platyzoa [10].

Анализ полных последовательностей гена 18S рРНК одного или трех видов гастротрих показывает их близость к плоским червям [11–13] и/или гнатостомулидам, или же помещает их в основание древа Bilateria после бескишечных турбеллярий и гнатостомулид [7]. В то же время, при анализе частичных последовательностей 7 видов близкого родства гастротрих с нематодами и коловратками не наблюдается [14], но при увеличении числа частичных последовательностей (14 видов) выявляется их возможная близость к гнатостомулидам, плоским червям и к группировке Syndermata, объединяющей коловраток и скребней [15].

Таким образом, филогенетический анализ морфологических и молекулярных данных разных авторов – как по отдельности, так и вместе – позволяет высказать разные гипотезы относительно родственных связей гастротрих. Некоторые из этих гипотез суммированы на рис. 1, где показано восемь возможных вариантов филогенетических отношений гастротрих с другими типами Bilateria. На рисунке не отражены варианты, помещающие

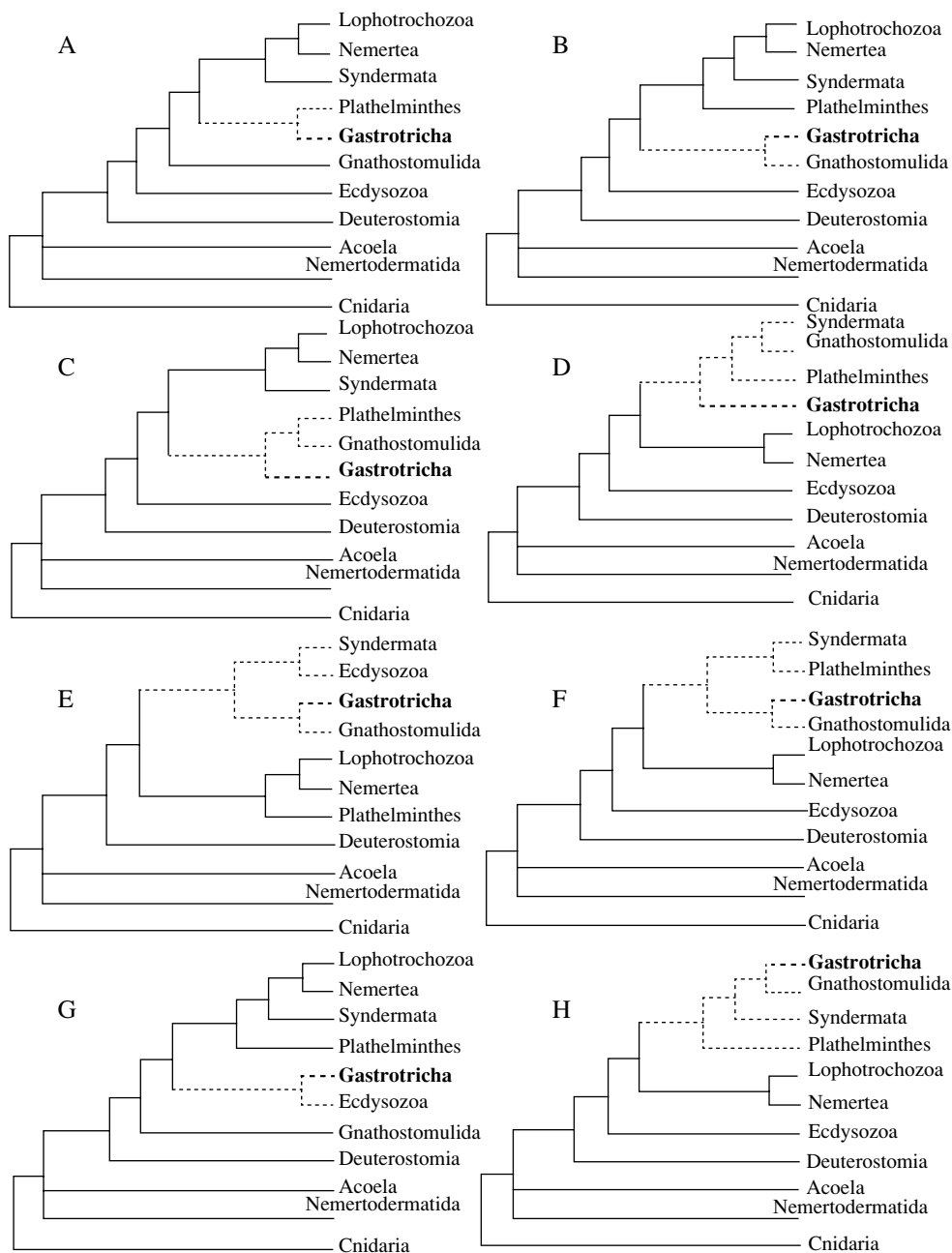
гастротрих в основание древа Bilateria, вблизи Acoela и Nemertodermatida [7, 16].

Внутренняя филогения гастротрих также остается весьма неясной. Большие различия по морфологии и ультраструктуре между представителями двух отрядов гастротрих дают основание считать эту группу парафилетичной относительно нематод [1, 17], однако недавний кладистический анализ морфологических признаков свидетельствует в пользу ее монофилии [18, 19]. Вместе с тем, остаются сомнения относительно монофилии семейств Lepidodasyidae и Planodasyidae отряда Macrodasysida, а также положения необычного рода *Neodasys*, имеющего ряд присущих представителям Macrodasysida морфологических признаков [3], но, тем не менее, выделяемого в отдельный подотряд Multitubulatina отряда Chaetonotida.

Таким образом, анализ молекулярных данных дает противоречивые результаты относительно как монофилии группы, так и филогенетических связей внутри нее [14, 15, 20] и пока не вносит ясности в очерченные выше вопросы. В настоящей работе филогенетические связи гастротрих изучали с использованием расширенного набора полных последовательностей генов 18S рРНК. К семи имевшимся последовательностям добавлены еще восемь определенных нами полных последовательностей, и проведен их филогенетический анализ в наборе с такими же последовательностями видов из разных групп беспозвоночных. Полученные результаты свидетельствуют о монофилии гастротрих, об их близости к группировке Plathelminthes + Syndermata + Nemertea + Lophotrochozoa и позволяют исключить некоторые варианты гипотез об их родственных связях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Гастротрих собирали** в окрестностях Морской биологической станции Санкт-Петербургского университета (Чупинская губа Канда拉克шского залива Белого моря) и фиксировали в 95% этиловом спирте (5–30 экземпляров каждого вида). В настоящей работе изучены следующие виды гастротрих. Отр. Chaetonotida: *Xenotrichula* sp. (сем.



**Рис. 1.** Возможные варианты филогении гастротрих. Вариант А сближает гастротрих с плоскими червями; В – с гнатостомулидами (Monokonta, или Neotrichozoa); С – объединяет в одну группу с плоскими червями и гнатостомулидами; D, F, H – представляют варианты концепции Platyzoa, объединяющей гастротрих с гнатостомулидами, плоскими червями и коловратками; Е и G – сближают гастротрих с группировкой линяющих животных, Ecdysozoa. Группировки с гастротрихами выделены пунктиром.

Xenotrichulidae), *Neodasya* sp. (сем. Neodasyidae); отр. Macrodasysida: *Tetranchyroderma* sp. (сем. Thaumastodermatidae), *Lepidodasya* sp., *Mesodasya* sp. и *Cephalodasya* sp. (сем. Lepidodasyidae), *Macrodasys buddenbrocki* (сем. Macrodasysidae), *Turbanella lutheri* и *T. cornuta* (сем. Turbanellidae).

**ДНК для последующей амплификации генов 18S рРНК выделяли** посредством щелочного ли-

зиса клеток с последующей нейтрализацией без дополнительной очистки [21] с модификациями. Несколько экземпляров животных помещали в 20 мкл 0.25 М NaOH, выдерживали при комнатной температуре 3–16 ч. Затем лизат нагревали 3 мин при 95°C, добавляли 10 мкл 0.5 М Трис-HCl, pH 8.2, и нейтрализовали 12 мкл 0.4 N HCl, после чего добавляли 5 мкл 2% раствора Тритона X-100 и нагревали 3 мин при 95°C. Лизат хранили при

–20°C, для амплификации использовали от 0.5 до 2 мкл лизата.

**Гены 18S рРНК амплифицировали** с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных эукариотических праймеров [22]. Продукты ПЦР очищали путем электрофореза в агарозном геле, затем для определения нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК использовали или очищенные продукты амплификации непосредственно, или после клонирования их в плазмидном векторе pBluescript KS+.

**Полученные нами полные последовательности генов 18S рРНК присоединяли** к выравниванию, содержащему полные последовательности этих генов еще семи видов гастротрих, а также видов из основных групп Bilateria и последовательность *Anemonia sulcata* (Cnidaria) в качестве внешней группы (табл. 1). Перед филогенетическим анализом из последовательностей “вырезали” нуклеотидные позиции, которые не поддаются однозначному выравниванию и относятся, в основном, к переменным участкам V4 и V7 молекулы 18S рРНК. Окончательный вариант выравнивания содержал 49 последовательностей по 1634 позиции.

**Филогенетические деревья генов 18S рРНК строили** методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML), используя пакет филогенетических программ RAUP, версия 4.b10 [23], программы mlsearch и DNArates [24], а также версию 3.01 программы MrBayes [25].

**Вычисление параметров модели эволюции последовательностей** для анализа методом ML выполняли с помощью программы Modeltest [26]. Параметры, полученные в первом цикле вычислений, применяли в соответствующем блоке RAUP для построения дерева методом связывания ближайших соседей (NJ), отбирая лучшее дерево по критерию минимальной эволюции. Полученное на этом этапе дерево использовали в следующем цикле вычислений с помощью Modeltest для уточнения параметров модели эволюции, которые применяли при реконструкции и выборе лучшего дерева методом максимального правдоподобия. Анализ повторяли до получения устойчивой топологии дерева.

**Байесовский анализ проводили**, используя общую модель обратимой эволюции с коррекцией на гетерогенность позиций по скорости эволюции и учетом доли инвариантных позиций (GTR +  $\Gamma$  + I), параметры которой вычислялись непосредственно программой MrBayes. В ходе анализа 400000 генераций по четырем марковским цепям отбирали 40000 деревьев, из которых 15000 отбрасывали как не достигшие стационарного состояния цепей, а по остальным 25000 строили консенсусное дерево с оценкой постериорной вероятности узлов этого дерева.

**Статистическую достоверность различий между деревьями оценивали** с помощью улучшенного AU-теста Шимодаиры [27], используя программу CONSEL [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все использованные нами методы реконструкции дали деревья одинаковой топологии, которая изображена на рис. 2. Для этого дерева характерны следующие принципиальные черты. 1) Две первые ветви Bilateria представлены бескишечными турбелляриями и немертодерматидами; 2) непосредственно вслед за отделением двух первых линий происходит расщепление Bilateria на вторичноротых (представлены полухордовыми) и первичноротых; 3) первую кладу первичноротых образуют линияющие животные с хитиновыми покровами – Ecdysozoa (представлены на дереве нематоморфами, приапулидами и киноринхами, членистоногими и нематодами); 4) гастротрихи отделяются в виде самостоятельной ветви вслед за Ecdysozoa и гнатостомулидами и входят в состав монофилетической группировки, включающей, кроме того, плоских червей (Plathelminthes), коловерток и скребней (Syndermata), немертин, а также группировку Lophotrochozoa, состоящую из брахиопод, моллюсков, вестиментифер, погонофор и кольчатых червей.

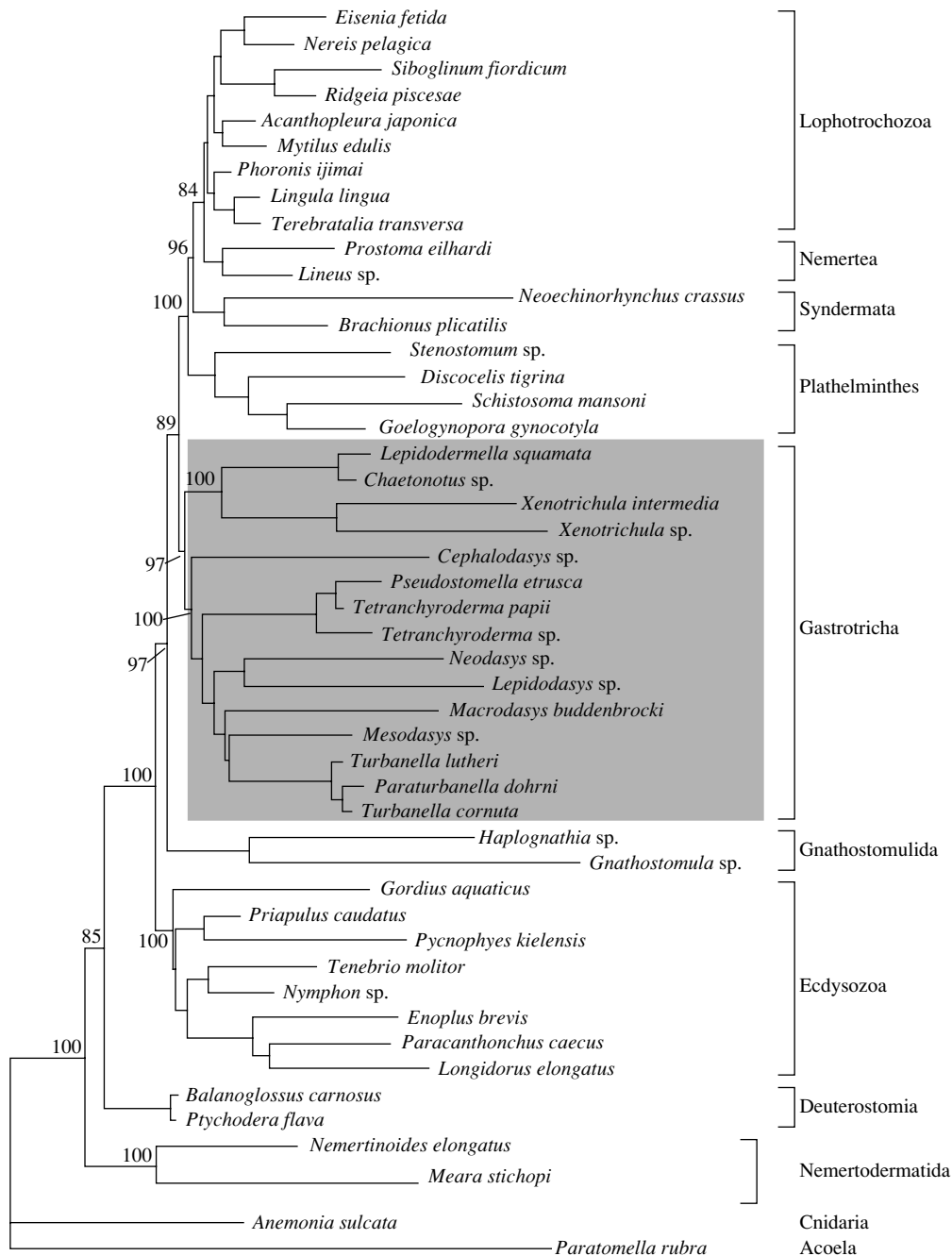
Основные монофилетические группировки (отмечены стрелками, указывающими на объединяющие их узлы) имеют высокую статистическую поддержку (показана цифрами у стрелок, означающими постериорную вероятность (ПВ) в процентном выражении). Так, стопроцентную ПВ имеют Bilateria в целом, Nemertodermatida, Ecdysozoa, вся кладу первичноротых животных и кладу Plathelminthes + Syndermata + Nemertea + Lophotrochozoa. В целом, монофилетическая группа гастротрих (ПВ = 97%) образует две одинаково хорошо поддерживаемые клады (ПВ = 100%), соответствующие отрядам Chaetonotida и Macrotrichida. Монофилетическая группа, включающая Gastrotricha и кладу Plathelminthes + Syndermata + Nemertea + Lophotrochozoa, имеет более слабую поддержку (ПВ = 89%), а вероятность кладу Gnathostomulida + Gastrotricha + Plathelminthes + Syndermata + Nemertea + Lophotrochozoa несколько выше (ПВ = 97%).

Полученное таким образом лучшее дерево мы сравнили с деревьями, отражающими другие возможные варианты филогенетических связей гастротрих. Кроме показанных на рис. 1 вариантов, в сравнение включены также два варианта с базальным положением гастротрих. Результаты сравнения с помощью улучшенного AU-теста [28] отражены в табл. 2.

Первым номером обозначено полученное нами лучшее по критерию ML дерево (рис. 2); номерам 2–9 соответствуют варианты филогении,

**Таблица 1.** Список последовательностей генов 18S рРНК, использованных в данной работе

Последовательности, определенные в данной работе		
таксономическое положение	видовое название	номер в ГенБанке
Gastrotricha, отр. Chaetonotida	<i>Xenotrichula</i> sp. aff. <i>velox</i>	AY963686
Gastrotricha, Neodasys	<i>Neodasys</i> sp.	AY963687
Gastrotricha, отр. Macrodasysida	<i>Macrodasys Buddenbrocki</i>	AY963692
	<i>Mesodasys</i> sp.	AY963690
	<i>Lepidodasys</i> sp.	AY963689
	<i>Cephalodasys</i> sp.	AY963691
	<i>Tetranchyroderma</i> sp. aff. <i>paradoxa</i>	AY963688
	<i>Turbanella luteri</i>	AY963693
Другие последовательности, использованные в данной работе		
Gastrotricha, отр. Chaetonotida	<i>Lepidodermella squammata</i>	U29198
	<i>Chaetonotus</i> sp.	AJ001735
	<i>Xenotrichula intermedia</i>	AY228128
Gastrotricha, отр. Macrodasysida	<i>Paraturbanella dohrni</i>	AY228139
	<i>Turbanella cornuta</i>	AF157007
	<i>Tetranchyroderma papii</i>	AY228137
	<i>Pseudostomella etrusca</i>	AY228136
Annelida, кл. Polychaeta	<i>Nereis pelagica</i>	AF474279
кл. Oligochaeta	<i>Eisenia fetida</i>	X79872
Pogonophora	<i>Siboglinum fiordicum</i>	X79876
Vestimentifera	<i>Ridgeia piscesae</i>	X79877
Mollusca, кл. Polyplacophora	<i>Acanthopleura japonica</i>	X70210
кл. Bivalvia	<i>Mytilus edulis</i>	L33448
Brachiopoda	<i>Lingula anatine</i>	X81631
	<i>Terebratalia transversa</i>	U12650
Phoronida	<i>Phoronis ijimai</i>	AY202113
Nemertea	<i>Prostoma eilhardi</i>	U29494
	<i>Lineus</i> sp.	X79878
Acanthocephala	<i>Neoechinorhynchus crassus</i>	AF001842
Rotifera	<i>Brachionus plicatilis</i>	U49911
Plathelminthes, "Turbellaria"	<i>Stenostomum</i> sp.	U95947
	<i>Discocelis tigrina</i>	U70078
	<i>Coelogygnopora gynocotylo</i>	AJ243679
	<i>Nemertinoidea elongatus</i>	AY078381
	<i>Meara stichopi</i>	AF119085
	<i>Paratomella rubra</i>	AF102892
кл. Trematoda	<i>Schistosoma mansoni</i>	U65657
Gnathostomulida	<i>Haplognathia</i> sp.	AF119084
	<i>Gnathostomula</i> sp.	AF119083
Nematomorpha	<i>Gordius aquaticus</i>	X87985
Priapulida	<i>Priapululus caudatus</i>	X80234
Kinorhyncha	<i>Pycnophyes kielensis</i>	U67997
Arthropoda, кл. Insecta	<i>Tenebrio molitor</i>	X07801
кл. Pycnogonida	<i>Nymphon</i> sp.	U88338
Nematoda	<i>Enoplus brevis</i>	U88336
	<i>Paracanthocheilus caecus</i>	AF047888
	<i>Longidorus elongatus</i>	AF036594
Hemichordata	<i>Balanoglossus carnosus</i>	D14359
	<i>Ptychodera flava</i>	AF278681
Cnidaria, Anthozoa	<i>Anemonia sulcata</i>	X53498



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево последовательностей 18S рРНК Bilateria. Дерево получено с помощью байесовского анализа набора из 48 последовательностей Bilateria вместе с последовательностью *Anemonia sulcata* в качестве внешней группы и по своей топологии соответствует деревьям, полученным методом ML. Монофилетическая группа гастроотрих выделена затенением. Стрелки указывают на узлы, объединяющие основные монофилетические группировки; цифры у стрелок обозначают величину статистической поддержки этих узлов в виде постериорной вероятности байесовского анализа, выраженной в процентах.

обозначенные на рис. 1 как А, В, С, D, E, F, G и H, номерам 10 и 11 – варианты филогении с более базальным положением гастроотрих. Все варианты расположены в порядке увеличения отличий от лучшего дерева по значению логарифма вероятности (второй столбец). Следующие восемь столбцов содержат показатели вероятности отличия

( $p$ ) каждого из сравниваемых вариантов филогении от лучшей. Эти показатели получены с помощью разных статистических тестов, реализованных в программе CONSEL [28]. Достоверным отличиям соответствуют значения  $p < 0.05$ .

Видно, что по всем статистическим тестам от лучшего дерева достоверно отличаются филогене-

**Таблица 2.** Статистическая оценка достоверности отличий полученного лучшего дерева от деревьев, отражающих другие варианты филогении гастротрих\*

Варианты филогении <sup>1</sup>	Величина отличий <sup>2</sup>	Показатели достоверности отличий в разных вариантах тестов							
		Au	Np	Vp	Pp	Kh	Sh	Wkh	Wsh
1	-5.4	0.907	0.669	0.674	0.996	0.852	0.983	0.798	0.986
3 (B)	5.4	0.239	0.072	0.073	0.004	0.148	0.741	0.148	0.539
7 (F)	10.0	0.326	0.157	0.068	5e-005	0.202	0.436	0.202	0.573
9 (H)	10.0	0.325	0.157	0.086	5e-005	0.202	0.436	0.202	0.573
2 (A)	10.3	0.066	0.023	0.021	3e-005	0.075	0.436	0.075	0.240
4 (C)	11.9	0.172	0.058	0.054	7e-006	0.127	0.369	0.127	0.401
5 (D)	15.7	0.071	0.019	0.020	2e-007	0.118	0.244	0.109	0.301
8 (G)	19.4	0.007	0.003	0.002	4e-009	0.030	0.156	0.030	0.074
10	19.5	0.004	0.009	0.011	4e-009	0.031	0.076	0.031	0.045
6 (E)	31.4	0.001	2e-004	2e-004	2e-014	0.014	0.029	0.009	0.037
11	59.5	1e-004	5e-005	0	1e-026	1e-004	3e-004	3e-004	0.001

\* Пояснения в тексте.

<sup>1</sup> Варианты филогении расположены в порядке увеличения отличий от лучшего дерева. Варианты 2–9 соответствуют топологиям А–Н на рис. 1, варианты 10–11 – топологиям с базальным положением гастротрих, не показанным на рисунке.

<sup>2</sup> Величина отличий отражает разницу по величине логарифма максимального правдоподобия ( $-\ln ML$ ) между топологиями лучшего дерева и деревьев, отражающих другие варианты филогении гастротрих.

ния E, объединяющая гастротрих с Gnathostomulida, Ecdysozoa и Syndermata, а также 10 и 11 (на рисунке не показаны), согласно которым гастротрихи находятся в основании дерева Bilateria после Acoela и Nemertodermatida или между ними. По большинству показателей (за исключением показателя Шимодаиры–Хасегавы, столбец Sh, и взвешенного показателя Шимодаиры–Хасегавы, столбец Wsh) отличается также топология G, сближающая гастротрих с линияющими Ecdysozoa. По трем показателям (столбцы Np, Vp и Pp) отличается топология D, представляющая собой один из вариантов концепции Platyzoa [10]. Все остальные варианты, в том числе и два других варианта концепции Platyzoa (F и H на рис. 1), отличаются от лучшего дерева только по самому мягкому показателю постериорных вероятностей (столбец Pp).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом результаты нашего анализа, включающего 15 полных последовательностей генов 18S рРНК гастротрих, совпадают с результатами многих других молекулярных реконструкций на основе генов 18S рРНК, показывающих раннее расщепление Bilateria на первично- и вторичноротых, разделение первичноротых на две клады – линияющих Ecdysozoa и нелинияющих Spiralia – и помещающих бескишечных турбеллярий в основание Bilateria [7, 29–32].

По нашим результатам, гастротрихи занимают, вслед за гнатостомулидами, пограничное положение

в монофилетической хорошо поддерживаемой группировке Spiralia. Все варианты филогении, не отличающиеся достоверно от филогении, представленной лучшим деревом нашего анализа, рассматривают гастротрих в составе именно этой группировки. Напротив, варианты филогении, так или иначе сближающие гастротрих с Ecdysozoa (рис. 1, E и G), достоверно отличаются от лучшего дерева по многим показателям. Ни одна из молекулярных реконструкций не показывает близкого родства гастротрих с нематодами или другими группами Ecdysozoa [11, 14, 15, 20, 33, 34]. Таким образом, наши результаты достаточно определенно противоречат гипотезам о сестринских отношениях гастротрих с нематодами [1] или с Ecdysozoa [5, 35], выдвинутыми на основе анализа морфологических данных.

Менее определенными можно считать вытекающие из наших результатов указания на близость гастротрих к гнатостомулидам. Возможность такой близости уже предполагали авторы работ, в которых гастротрихи и гнатостомулиды объединялись в одну группу под названием Monokonta [10] или под названием Neotrichozoa [33]. Согласно нашему анализу, вариант филогении, объединяющих гастротрих с плоскими червями (рис. 1a), отличается от лучшего дерева по результатам трех статистических тестов (табл. 2, строка 5, столбцы Np, Vp и Pp). Вариант B, объединяющий гастротрих с гнатостомулидами (рис. 1б), отличается от лучшего дерева только по одному, самому мягкому статистическому критерию (табл. 2,

строка 2, столбец Pp). Таким образом, объединение с гнатостомулидами выглядит более предпочтительным, чем объединение с плоскими червями, на близость гастротрих с которыми указывали результаты первых молекулярных анализов [11]. Из трех вариантов топологии, отражающих концепцию Platyzoa (рис. 1, D, F и H), топологии F и H, сближающие гастротрих и гнатостомулид, отличаются от топологии лучшего дерева в меньшей степени, чем топология D, на которой гастротрихи удалены от гнатостомулид (табл. 2). В целом варианты филогении, сближающие гастротрих с гнатостомулидами, отличаются от полученного нами дерева (рис. 2) по результатам хотя бы одного статистического теста, но ни один из них не отличается по результатам всех проведенных тестов. Отсюда вытекает, что на основе представленного в настоящей работе анализа эти варианты филогении не могут быть с полной определенностью исключены.

Что касается монофилии гастротрих и внутренней филогении группы, то, в противоположность некоторым гипотезам [17, 36], а также результатам наших более ранних анализов частичных последовательностей 18S рРНК [20], дерево полных последовательностей показывает хорошо поддерживаемую (ПВ = 97%) монофилию гастротрих. В свою очередь, клада гастротрих распадается на две статистически достоверные (ПВ = 100%) клады, соответствующие отрядам Macrodasysida и Chaetonotida. Это хорошо согласуется с результатами других молекулярных анализов [15, 20], но противоречит более ранним результатам, полученным в работе Вирца и соавт. [14]. В противоречие с результатами упомянутой работы вступают также наши данные о положении рода *Mesodasys*. На нашем дереве, как и на дереве генов 18S рРНК других авторов [15], этот род группируется, хотя и с невысокой поддержкой (ПВ = 45%), с видами семейства Turbanellidae внутри клады Macrodasysida, что свидетельствует о полифилии семейства Lepidodasysidae, к которому его относят. Все это подтверждает наше предположение [20] о том, что в определении видов гастротрих или этикетировании препаратов ДНК в работе Вирца и соавт. [14] имелись ошибки, явившиеся источником отмеченных противоречий. Последовательность представителя рода *Neodasys* на нашем дереве группируется с последовательностью *Lepidodasys* в составе клады Macrodasysida, что противоречит результатам морфологического анализа [18], а также принимаемому большинством зоологов положению этого рода в составе отр. Chaetonotida. Результаты нашего анализа с высокой достоверностью (ПВ = 100%) подтверждают монофилию семейств Xenotrichulidae и Chaetonotidae в составе клады Chaetonotida. Поддержка других внутренних узлов клады гастротрих гораздо слабее.

В целом наши результаты показывают, что гастротрихи представляют собой монофилетическую группу беспозвоночных животных, находящуюся на филогенетическом древе Bilateria в основании группировки Spiralia в непосредственной близости к гнатостомулидам и плоским червям. Этот вывод позволяет отбросить гипотезы о близости гастротрих к нематодам или к группировке линияющих первичноротых животных (Ecdysozoa), но не исключает некоторых альтернативных вариантов родственных связей гастротрих с другими группами животных. Таким образом, проблема филогенетических связей гастротрих между собой и с другими группами беспозвоночных не находит пока окончательного решения ни на основе морфологии, ни по молекулярным данным с использованием генов 18S рРНК. Очевидно, что для ее решения требуется существенно увеличить число исследуемых видов, а также привлечь для анализа последовательности других генов.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-49705, 06-04-49288), а также Министерства образования Российской Федерации (УР.07.03.070/04).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boaden P.J.S. 1985. Why is a gastrotrich? In: *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. Eds Conway M.S., George J.D., Gibson R., Platt H.M. Oxford: Clarendon Press, pp. 248–260.
2. Lorenzen S. 1985. Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. Eds Conway M.S., George J.D., Gibson R., Platt H.M. Oxford: Clarendon Press, pp. 210–223.
3. Ruppert E.E. 1991. Gastrotricha. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. V. 4. Aschelminthes. Eds Harrison F.W., Ruppert E.E. N.Y.: Wiley-Liss, pp. 41–109.
4. Wallace R.L., Ricci C., Melone G. 1996. A cladistic analysis of pseudocoelomate (aschelminth) morphology. *Invertebr. Biol.* **115**, 104–112.
5. Nielsen C. 2001. *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford: Oxford University Press, 578 p.
6. Sørensen M.V., Funch P., Willerslev E., Hansen A.J., Olesen J. 2000. On the phylogeny of the Metazoa in light of Cycliophora and Micrognathozoa. *Zool. Anz.* **239**, 297–318.
7. Peterson K.J., Eernisse D.J. 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA sequences. *Evol. Dev.* **3**, 170–205.
8. Schmidt-Rhaesa A. 2002. Two dimensions of biodiversity research exemplified by Nematomorpha and Gastrotricha. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 633–640.
9. Garey J.R., Schmidt-Rhaesa A. 1998. The essential role of “minor” phyla in molecular studies of animal evolution. *Amer. Zool.* **38**, 907–917.
10. Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* **73**, 203–266.



11. Winnepeninckx B., Backeljau T., Mackey L.Y., Brooks J.M., De Wachter R., Kumar S., Garey J.R. 1995. 18S rRNA data indicate that Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 1132–1137.
12. Giribet G., Distel D.L., Polz M., Sterrer W., Wheeler W.C. 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the Acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* **49**, 539–562.
13. Giribet G. 2002. Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A paradigm for the Cambrian explosion? *Mol. Phyl. Evol.* **24**, 345–357.
14. Wirz A., Pucciarelli S., Micelli C., Tongiorgi P., Balsamo M. 1999. Novelty in phylogeny of Gastrotricha: evidence from 18S rRNA gene. *Mol. Phyl. Evol.* **13**, 314–318.
15. Todaro M.A., Littlewood D.T.J., Balsamo M., Herniou E.A., Cassanelli S., Manicardi G., Wirz A., Tongiorgi P. 2003. The interrelationships of the Gastrotricha using nuclear small rRNA subunit sequence data, with an interpretation based on morphology. *Zool. Anz.* **242**, 145–156.
16. Dewell R.A. 2000. Colonial origin for Metazoa: major morphological transition and the origin of bilaterian complexity. *J. Morphol.* **243**, 35–74.
17. Ruppert E.E. 1982. Comparative ultrastructure of the gastrotrich pharynx and the evolution of myoepithelial foreguts in Aschelminthes. *Zoomorphology.* **99**, 181–220.
18. Hochberg R., Litvaitis M.K. 2000. Phylogeny of Gastrotricha: a morphology-based framework of gastrotrich relationships. *Biol. Bull.* **198**, 299–305.
19. Hochberg R., Litvaitis M.K. 2001. Macrotrichida (Gastrotricha): a cladistic analysis of morphology. *Invertebrat. Biol.* **120**, 124–135.
20. Manylov O.G., Vladychenskaya N.S., Milyutina I.A., Kedrova O.S., Korokhov N.P., Dvoryanchikov G.A., Aleshin V.V., Petrov N.B. 2004. Analysis of 18S rRNA gene sequences suggests significant molecular differences between Macrotrichida and Chaetonotida (Gastrotricha). *Mol. Phyl. Evol.* **30**, 850–854.
21. Floyd R.M., Abebe E., Papert A., Blaxter M.L. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* **11**, 839–850.
22. Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 1 6S-like rRNA-coding regions. *Gene.* **71**, 491–499.
23. Swofford D.L. 2002. *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
24. Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B.H., Wolinsky S., Bhattacharya T. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science.* **288**, 1789–1796.
25. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* **17**, 754–755.
26. Posada D., Crandall K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* **14**, 817–818.
27. Shimodaira H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **51**, 492–508.
28. Shimodaira H., Hasegawa M. 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics.* **17**, 1246–1247.
29. Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R., Lake J.A. 1997. Evidence for a clade nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature.* **387**, 489–493.
30. Winnepeninckx B., Backeljau T., Kristensen R., 1998. Relation of the new phylum Cycliophora. *Nature.* **393**, 636–638.
31. Littlewood D.T.J., Telford M.J., Clough K.A., Rohde K. 1998. Gnathostomulida – an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol. Phyl. Evol.* **9**, 72–79.
32. Ruiz-Trillo I., Riutort M., Littlewood D.T., Herniou E.A., Bagaña J. 1999. Acoel flatworms: Earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science.* **283**, 1919–1923.
33. Zrzavý J., Mihulka S., Kepka P., Bezděk A., Tietz D. 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics.* **14**, 249–285.
34. Zrzavý J. 2001. The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum- and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia Parasitologica.* **48**, 81–103.
35. Schmidt-Rhaesa A. 1998. Phylogenetic relationships of the Nematomorpha – a discussion of current hypotheses. *Zool. Anz.* **236**, 203–216.
36. Rieger G.E., Rieger R.M. 1977. Comparative fine structure study of the gastrotrich cuticle and aspects of the cuticle evolution within the Aschelminthes. *Z. Zool. Syst. Evolutionforsch.* **15**, 81–124.