

# Interstitial telomere sequences in chromosomes of Baikal planarians

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Koroleva A.G.<sup>1\*</sup>, Evtushenko E.V.<sup>2</sup>, Zaytseva E.P.<sup>3</sup>, Porfiriev A.G.<sup>4</sup>,  
Timoshkin O.A.<sup>1</sup>, Kirilchik S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 8/2 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia

<sup>3</sup>Baikal Museum, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 1 Akademicheskaya Str., Listvyanka, 664520, Russia

<sup>4</sup>Department of Zoology and General Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** The presence of internal telomeric sequences (ITSs) in chromosomes typically indicates instances of genome reorganization. Changes in morphology and chromosome number can be sources of intraspecific polymorphism and also lead to speciation. Both variants are found in flatworms, but ITSs are rare in chromosomes, as is common in other invertebrate animals. Out of 23 flatworm species ITSs has been identified in only three parasitic species. Using FISH with telomeric probes, we found that ITSs are also present in the chromosomes of the endemic Baikal planarians *Baikalobia* Kenk, 1930 (Tricladida, Continenticola, Dendrocoelidae). This is the first time that ITSs has been identified in free-living flatworms. Like *Shistosoma* Weinland, 1858, the appearance of ITSs in the Baikal planarians could be associated with the process of speciation. There is no data yet on ITSs in other dendrocoelids, and the question remains whether ITSs are a specific feature of Baikal planarians or a special feature of all dendrocoelids.

**Keywords:** internal telomeric sequences, ITSs, FISH, flatworms, planarians, Lake Baikal

## 1. Introduction

Internal telomeric sequences (ITSs) are telomeric DNA located anywhere on the chromosome except the terminal regions (Meyne et al., 1990). They can arise for several reasons, including as a result of chromosomal rearrangements during genome evolution, repair of double-strand DNA breaks, and the introduction of extrachromosomal telomeric DNA into chromosomes and its amplification (Bolzán and Bianchi, 2006; Ruiz-Herrera et al., 2008; Bolzán, 2012). As a rule, ITSs are not associated with telomere functions, unless one takes into account their specific role in maintaining genome plasticity, since they are known to induce mutations and are localized at fragile sites where chromosome breaks occur (Moore et al., 2018; Lin and Yan, 2008).

There are four groups of ITSs: short ITSs, subtelomeric ITSs, fusion ITSs (resulting from the fusion of chromosomes) and heterochromatic ITSs (Bolzán, 2017). They differ in size, location and nucleotide environment, and also arise through different mechanisms. Short ITSs have a size of 100-120 bp and can be surrounded by both unique sequences and SINE,

LINE, LTR retrotransposons. The length of subtelomeric ITSs is measured in hundreds of nucleotides and may include degenerate telomeric repeats. The ITSs fusions have a head-to-head orientation and are flanked by subtelomeric DNA, indicating instances of two chromosomes joining at telomeric regions. Their sizes can vary from several kilobases (kb) to several tens of kb. Heterochromatic ITSs are the largest sequences, up to several hundred kb in size. They are often found in pericentromeric regions, but can also occur on chromosome arms and also form microchromosomes (Bolzán, 2017).

The sensitivity of conventional Fluorescence in situ hybridization (FISH) allows the visualization of sequences 1000 bp or longer (Poon et al., 1999), i.e. it is difficult to detect short and subtelomeric ITSs using this method. However, this method is capable of recording the most significant chromosomal rearrangements in the evolution of the karyotype, which can affect telomeric regions. In the chromosomes of vertebrates, ITSs larger than 1000 bp are quite common and are located mainly near centromeres (Meyne et al., 1990; Bolzán et al., 2017; Vicari et al., 2022). Usually, this is a consequence

\*Corresponding author.

E-mail address: [ankor-2015@yandex.ru](mailto:ankor-2015@yandex.ru) (A.G. Koroleva)

**Received:** December 26, 2023; **Accepted:** February 05, 2024;

**Available online:** February 29, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



of Robertsonian translocations (Slijepcevic, 1998), although such chromosomal mutations do not always lead to the appearance of ITSs (Souza et al., 2016). ITSs longer than 1000 bp are not so widespread among invertebrates (Vítková et al., 2005; Traut et al., 2007; Vicari et al., 2022). For example, among mollusks, such ITSs were found in only two of 23 species studied in this regard (Nomoto et al., 2001; Godwin et al., 2012). Among flatworms, FISH data with telomeric probes are known for 23 species, most of them parasites (Table 1), and ITSs were found only in the sex chromosomes of two trematode species (Hirai, 2014) and one cestode species (Špakulová et al., 2019). ITSs have not yet been identified in free-living flatworms.

We used FISH with telomeric TTAGGG probes to identify the localization of telomeric repeats in the chromosomes of two species of endemic planarians of the genus *Baikalobia*, an autochthonous group of Baikal Dendrocoelidae. ITSs were found in both worm species. Also in this work, we analyzed the phylogenetic relationships of flatworms taking into account ITSs in their chromosomes.

## 2. Materials and methods

Planarians were manually collected in the Listvyanichny Bay of Lake Baikal (51°52'02.4"N 104°49'55.2"E) in September 2011. The material was collected on the outside of stones at the depth of about 1 m. After that, worms were placed in a thermal container with Baikal water and taken to the laboratory, where they were kept until analysis. Tissues from two *Baikalobia* species were used for FISH: *B. guttata* Gerstfeldt, 1858 and *B. variegata* Korotneff, 1912 (3 individuals of each species). Species included in the phylogenetic analysis are presented in Table 1.

### 2.1. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Chromosome preparations were prepared from homogenized worm tissues. Tissues were placed in 0.56% KCl, minced and left at 37°C for 15 min. Then they were fixed with a mixture of methanol and acetic acid (3:1), kept at +5°C for 15 minutes, centrifuged, the supernatant was removed, and the procedure was repeated three times. A cell suspension was dropped onto glass slides cooled to -20°C over water vapor (70-80°C) and dried for 10 minutes. Before hybridization, the preparations were kept at room temperature for several days.

The telomeric probe was generated by template-free PCR (Ijdo et al., 1991) and labeled with Bio-11-dUTP by PCR with primers for telomeric regions. FISH of the telomere probe on the preparations was carried out in accordance with the protocol (Joffe et al., 1998) with some modifications. After washing in 1 × PBS containing 50 mM Mg<sup>2+</sup>, the preparations were treated with 0.12% trypsin for 20 s. Next, the preparations were fixed in 0.5% formaldehyde and 1 × PBS for 10 min, washed in 2 × SSC, and dehydrogenated

in ethanol. The hybridization mixture (20 µl) contained 50% formamide, 2xSSC and a telomeric probe. Before hybridization, the mixture was denatured for 5 min at 96°C, cooled in ice, and applied to the preparation. Hybridization proceeded overnight at 42°C. Detection of the biotinylated probe was carried out using fluorescently labeled streptavidin (Streptavidin-Cy3, Sigma, USA). The preparations were stained with DAPI fluorochrome (4,6-diamino-2-phenylindole, 0.5 µg/ml) in Vectashield medium (Vector laboratories, UK) and analyzed on an Olympus BX51 fluorescence microscope. Chromosomes were photographed at 100x magnification (DP70 camera, X-Cite 120Q light source).

### 2.2. Phylogenetic analysis

DNA extraction, PCR of the 18S rRNA gene and sequencing were carried out as described in article by Porfiriev and coauthors (Porfiriev et al., 2018). The alignment of the resulting nucleotide sequences was carried out in the ClustalW1.6 program (Thompson et al., 1994). The execution of phylogenetic reconstruction was done using MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) in accordance the GTR+G model. The calculation of Markov chains (MCMC) involved 10 000 000 generations (4 chains in parallel) and the recording of parameters every 1000 generations. The likelihood method was stabilized by using the first 25% of generations, while the rest was used to estimate the posterior probability. The reliability criterion was a posterior probability exceeding 95%. MEGA7 (Kumar et al., 2016) was also used to reconstruct trees, which was accomplished by using both Neighbor-Joining and K2P models, which were tested in 1000 replications using a bootstrap test. The implementation of graphic editing of the tree was done in FigTree version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and MEGA7.

## 3. Results

### 3.1. FISH

*B. guttata* and *B. variegata*, two species of Baikal planarians, were the targets of this method's using (Fig. 1). Their haploid set is the same and amounts to 15 chromosomes, that was shown by T. M. Umylina in the 70s (Umylina, 1973; 1976; 1977). Figure 1 shows that TTAGGG repeats are present not only at the ends, but also inner of chromosomes, which indicates the presence of ITSs in the analyzed species. Moreover, in the species *B. guttata* they are located on one chromosome (Fig. 1 c, d), and in the species *B. variegata* ITSs they are probably located on two different chromosomes (Fig. 1 h).

### 3.2. Phylogenetic analysis and ITSs

To carry out phylogenetic analysis, nucleotide sequences of the 18S rRNA gene were obtained for *B. guttata* and *B. variegata*; for other species of flatworms, the sequences of this gene were taken from the GenBank database (Table 1). The length of the analyzed regions after the alignment was about 2000 bp. 655 informative

**Table 1.** The analyzed species with/without ITSs and the sequenced 18S rRNA gene

Species	2n	ITSs (FISH)	Accession number 18S rRNA (GenBank)
TRICLADIDA			
<i>Baikalobia guttata</i> Gerstfeldt, 1858	30	yes <sup>1</sup>	KY848668.1
<i>B. variegata</i> Korotneff, 1912	30	yes <sup>1</sup>	OR758633.1
<i>Polycelis tenuis</i> Ijima, 1884	14	no <sup>2</sup>	Z99949.1
<i>Dugesia ryukyuensis</i> Kawakatsu, 1976	14	no <sup>2</sup>	AF050433.1 (type II)
MONOGENEA			
<i>Paradiplozoon homoion</i> Bychowsky et Nagibina, 1959	14	no <sup>3</sup>	KY640614.1
CESTODA			
<i>Caryophyllaeus laticeps</i> Pallas, 1781	20	no <sup>4</sup>	AJ287488.1
<i>Caryophyllaeides fennica</i> Schneider, 1902	20	no <sup>4</sup>	KF990172.1
<i>Nippotaenia mogurndae</i> Yamaguti et Miyata, 1940	28	no <sup>4</sup>	AJ287545.1
<i>Atractolytocestus huronensis</i> Anthony, 1958	24 (3n)	yes <sup>9</sup>	OM972659.1
TREMATODA			
<i>Schistosoma mansoni</i> Sambo, 1907	16	yes <sup>5</sup>	U65657.1
<i>S. haematobium</i> Bilharz, 1852	16	yes <sup>5</sup>	Z11976.1
<i>S. japonicum</i> Katsurada, 1904	16	no <sup>5</sup>	Z11590.1
<i>S. sinensium</i> Pao, 1959	16	no <sup>5</sup>	AY157225.1
<i>Clonorchis sinensis</i> Looss, 1907	14	no <sup>6</sup>	JF823988.1
<i>Metorchis xanthosomus</i> Creplin, 1846	14	no <sup>6</sup>	OK384552.1
<i>M. bilis</i> (Braun, 1790) Odening, 1962	14	no <sup>6</sup>	OK384551.1
<i>M. orientalis</i> Tanabe, 1920	-	-	JF314771.1
<i>Opisthorchis viverrini</i> (Poirier, 1886) Stiles & Hassal, 1896	14	no <sup>6</sup>	JF823987.1
<i>O. felineus</i> Rivolta, 1884 Blanchard, 1895	14	no <sup>6</sup>	MF077357.1
<i>Bucephalus minimus</i> (Stossich, 1887) Nicoll, 1914	14	no <sup>7</sup>	-
<i>B. australis</i> (Szidat, 1961) Yamaguti, 1971	14	no <sup>7</sup>	-
<i>Monascus filiformis</i> (Rudolphi, 1819) Looss, 1907	18	no <sup>7</sup>	-
<i>Cercaria longicaudata</i> Tang, 1990	16	no <sup>7</sup>	-
<i>Bacciger bacciger</i> (Rudolphi, 1819) Nicoll, 1914	12	no <sup>7</sup>	-
MACROSTOMORPHA			
<i>Macrostomum lignano</i> Ladurner, Schärer, Salvenmoser, & Rieger, 2005	8	no <sup>8</sup>	FJ715306.1
ACOELOMORPHA			
<i>Hofstenia miamia</i> Correa 1960	-	-	AM701817.1

**Note:** 1 - gene sequences and FISH results were gave by us; 2 - Joffe et al., 1996; 3 - Tasaka et al., 2013; 4 - Bombarová et al., 2009; 5 - Hirai et al., 2000, Hirai, 2014; 6 - Zadesenets et al., 2012; 7 - García-Souto and Pasantes, 2015; 8 - Zadesenets et al., 2016; 9 - Špakulová et al., 2019. Dash means absent of complete information.

sites were identified. Both MrBayes 3.2.7 and MEGA7 programs produced trees of similar topology. Figure 2 shows the phylogenetic tree obtained in MrBayes. In general, representatives of different orders cluster into separate clades with high statistical support; the representative of Macrostomorpha forms a separate branch, along with the outgroup *Hofstenia miamia*.

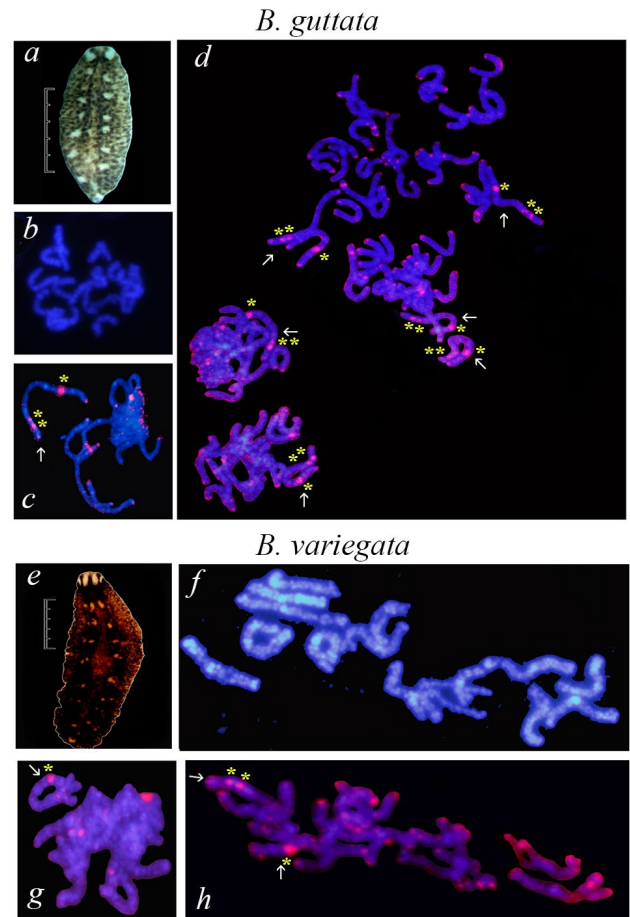
#### 4. Discussion and conclusions

##### 4.1. ITSs in parasitic and free-living flatworms

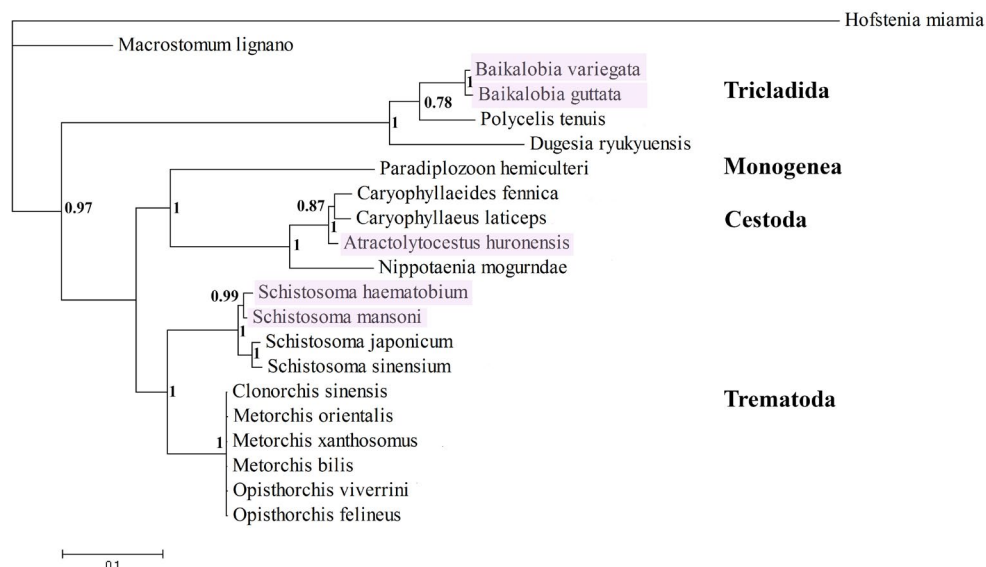
In the evolution of some groups of animals, intra- or interchromosomal rearrangements, as well as genomic mutations, played a decisive role (Trifonov

et al., 2012; 2016; Dehal and Boore, 2005). In this regard, tracking chromosomal mutation markers such as ITSs makes it possible to assess the contribution of chromosomal rearrangements to speciation.

During the evolution of flatworms, numerous karyotype transformations also occurred. As in the case of nematodes and other types of invertebrate animals (Stein et al., 2003; Ghedin et al., 2007; Dubinin et al., 1936), a significant contribution of intrachromosomal rearrangements was noted for flatworms (Swain et al., 2011), which is probably due to the presence of a large number of repeating sequences in their genome, including LTR retroelements (Grohme et al., 2018). ITSs data were obtained for a small number of representatives of different orders/classes (Table 1). Based on these data, we can conclude that ITSs are not typical for the chromosomes of these animals, as for other invertebrates. Previously, ITSs were found only in parasitic flatworms (Hirai, 2014; Špakulová et al., 2019). The detection of ITSs in the sex chromosomes of parasites, in this case schistosomes, is associated with several inversions and heterochromatization (Hirai et al., 2012; Hirai, 2014). The appearance of ITSs was associated with the spread of these parasites from Asia to Africa and with subsequent speciation (Hirai, 2012). It is worth noting that schistosomes have a unique sex determination system among hermaphroditic trematodes (ZZ male, ZW female), and the sex chromosomes have undergone significant reorganization during the evolution, as evidenced by ITSs. Baikal planarians, like most flatworms, are hermaphrodites and do not have separate gonosomes. Similarly, speciation in *Baikalobia* worms may have been accompanied by the emergence of ITSs (Fig. 1). Free-living flatworms often have genomic mutations associated with changes in the number of chromosomes. They can be random, as in the case of the macrostomorph *Macrostemum lignano*, which has a high percentage of aneuploids (Zadesenets et al., 2016). In the case of planarians, the adaptive nature of changes in the number of chromosomes was revealed:



**Fig.1.** Telomere signals (pink) in meiotic chromosomes of Baikal planarians (chromosomes stained with DAPI, blue): a, e – appearance of worms, the scale is 1 cm; b, f – 15 pairs of chromosomes; c, d, g, h – FISH shows telomeric repeats TTAGGG in *B. guttata* and *B. variegata*. Arrows point at chromosomes with ITS. Yellow asterisks indicate ITS. A number of chromosome sets is shown in figure d.



**Fig.2.** 18S rRNA gene phylogenetic tree (MrBayes 3.2.7). Species with ITSs are highlighted in pink. On the right are the flatworm order names. The nodes indicate the posterior probability values. The scale shows genetic distances.

with increasing latitude, the number of chromosomes also increased (Lorch et al., 2016). At the same time, changes in the number of chromosomes during the evolution of planarians accompanied speciation, for example in the genus *Bdellocephala*, including among the Baikal representatives (Umylina, 1971; Kuznedelov et al., 2000; Novikova et al., 2006). Concurrently, changes occurred in the morphology of chromosomes, which indicates a significant reorganization of the genome. The endemic planarians of Lake Baikal have, as a rule, 30 chromosomes with a predominance of metacentrics and submetacentrics in the karyotype (Umylina, 1973, 1976, 1977). The stability of the number of chromosomes and the rarity of telocentric and acrocentric chromosomes in this morphologically and ecologically very diverse group of triclads may indicate the predominance of intrachromosomal changes during the evolution of their genomes, as in other flatworms. Unfortunately, we do not know whether the common ancestor of all Baikal triclads had ITSs in their chromosomes or whether they appeared only during the evolution of a separate branch of *Baikalobia*.

## 4.2. ITSs and flatworm phylogeny

Early in the evolution of flatworms, an important event occurred involving the loss of centrosomes (Azimzadeh et al., 2012). This accompanied the emergence of several groups of flatworms, which are now combined into a taxon Acentrosomata. It includes four orders Tricladida, Fecampiida, Prolecithophora, Bothrioplanida and three class of parasitic worms Monogenea, Cestoda and Trematoda (Egger et al., 2015; Collins, 2017). ITSs were identified in representatives of Tricladida, Trematoda and Cestoda, but were absent in the studied representatives of other Acentrosomata, as well as in the rather distant clade Macrostomorpha (Fig. 2), indicating the independence of the pathways leading to the appearance of ITSs in free-living and parasitic flatworms. Within the order Tricladida, representatives of the two families Planariidae and Dugesiidae lack ITSs, but they appear in the family Dendrocoelidae among Baikal endemics (Fig. 1). Representatives of only this family are found in Lake Baikal.

Further study of ITSs in representatives of the family Dendrocoelidae will help to understand at what stage of evolution the genome reorganization occurred, leading to the appearance of ITSs, and whether this event was a feature of the Baikal endemics or all dendrocoelids.

## Acknowledgments

The work was carried out thanks to the State Project 0279-2021-0007 (121032300180-7) “Complex studies of the nearshore zone...” and 0279-2021-0005 (121032300224-8) “Environmental transformations of basins..., as well as was supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grants №51, №12-04-32052, №13-04-01270 and №18-34-00395.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Azimzadeh J., Wong M.L., Downhour D.M. et al. 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. *Science* 335 (6067): 461–463. DOI: [10.1126/science.1214457](https://doi.org/10.1126/science.1214457)
- Bolzán A.D. 2012. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 27: 1–15. DOI: [10.1093/mutage/ger052](https://doi.org/10.1093/mutage/ger052)
- Bolzán A.D. 2017. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. *Mutation Research* 773: 51–65. DOI: [10.1016/j.mrrev.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.04.002)
- Bolzán A.D., Bianchi M.S. 2006. Telomeres interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 612: 189–214. DOI: [10.1016/j.mrrev.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.12.003)
- Bombarová M., Vítková M., Spakulová M. et al. 2009. Telomere analysis of plathyhelminths and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization. *Genome* 52 (11): 897–903. DOI: [10.1139/g09-063](https://doi.org/10.1139/g09-063)
- Collins J. J. 2017. Plathyhelminthes. *Current Biology* 27 (7): R252–R256. DOI: [10.1016/j.cub.2017.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016)
- Dehal P., Boore J.L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology* 3 (10): e314. DOI: [10.1371/journal.pbio.0030314](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314)
- Dubinín N.P., Sokolov N.N., Tiniakov G.G. 1936. Occurrence and distribution of chromosome aberration in nature (Diptera). *Nature* 137: 1035–1036
- Egger B., Lapraz F., Tomiczek B. et al. 2015. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Current Biology* 25 (10): 1347–1353. DOI: [10.1016/j.cub.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.034)
- García-Souto D., Pasantes J.J. 2015. Molecular cytogenetics in digenean parasites: linked and unlinked major and 5S rDNAs, B chromosomes and karyotype diversification. *Cytogenet Genome Research* 147 (2–3): 195–207. DOI: [10.1159/000442504](https://doi.org/10.1159/000442504)
- Ghedín E., Wang S., Spiro D. et al. 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317(5845): 1756–1760. DOI: [10.1126/science.1145406](https://doi.org/10.1126/science.1145406)
- Grohme M.A., Schloissnig S., Rozanski A. et al. 2018. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* 554 (7690): 56–61. DOI: [10.1038/nature25473](https://doi.org/10.1038/nature25473)
- Godwin R., Brown I., Montgomery S. et al. 2012. Telomere dynamics in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*): an investigation into the effects of age, tissue type, location and time of sampling. *Marine Biology* 159: 77–86. DOI: [10.1007/s00227-011-1791-7](https://doi.org/10.1007/s00227-011-1791-7)
- Ijdo J., Wells R., Baldini A. et al. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR. *Nucleic Acid Research* 19 (17): 4780. DOI: [10.1093/nar/19.17.4780](https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780)
- Hirai H. 2014. Chromosomal differentiation of schistosomes: what is the message? *Front Genet* 5: 301. DOI: [10.3389/fgene.2014.00301](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00301)
- Hirai H., Hirai Y., LoVerde P.T. 2012. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. *Parasitol Int* 61(4): 684–689. DOI: [10.1016/j.parint.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.007)
- Hirai H., Taguchi T., Saitoh M. et al. 2000. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex. *Int J Parasitol* 30: 441–452. DOI: [10.1016/s0020-7519\(99\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00186-1)

- Huelsenbeck J., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 7 (8): 754–755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1996. Ends of chromosomes in *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes) have telomere repeat TTAGGG. *Chromosome Res* 4: 323–324. DOI: [10.1007/BF02263686](https://doi.org/10.1007/BF02263686)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1998. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* 107: 173–183. DOI: [10.1007/s004120050294](https://doi.org/10.1007/s004120050294)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
- Kuznedelov K.D., Novikova O.A., Naumova T.V. 2000. The molecular genetic typification of planarians in the genus *Bdellocephala* (Dendrocoelidae, Tricladida, Turbellaria) from Lake Baikal with an assessment of their species diversity. *Zhurnal Obshey Biologii* 61(3): 336–44. (In Russian)
- Lin K.W., Yan J. 2008. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research* 658: 95–110. DOI: [10.1016/j.mrrev.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.006)
- Lorch S., Zeuss D., Brandl R. et al. 2016. Chromosome numbers in three species groups of freshwater flatworms increase with increasing latitude. *Ecol Evol* 6 (5): 1420–1429. DOI: [10.1002/ece3.1969](https://doi.org/10.1002/ece3.1969)
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H. et al. 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10. DOI: [10.1007/BF01737283](https://doi.org/10.1007/BF01737283)
- Moore A., Dominska M., Greenwell P. et al. 2018. Genetic control of genomic alterations induced in yeast by interstitial telomeric sequences. *Genetics* 209 (2): 425–438. DOI: [10.1534/genetics.118.300950](https://doi.org/10.1534/genetics.118.300950)
- Nomoto Y., Hirai M., Ueshima R. 2001. Cloning of molluscan telomere DNA with (TTAGGG)<sub>n</sub> repeat and its chromosomal location in the freshwater snail *Biwamelania habei*. *Zoology Science* 18: 417–422. DOI: [10.2108/zsj.18.417](https://doi.org/10.2108/zsj.18.417)
- Novikova O., Naumova T., Timoshkin O. A. 2006. Karyotypes and current approaches to the systematics of endemic Baikal representatives of *Bdellocephala* genus (Turbellaria, Dendrocoelidae). *Hydrobiologia* 568 (S):183–191. DOI: [10.1007/s10750-006-0316-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0316-8)
- Poon S.S., Martens U.M., Ward R.K. et al. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36: 267–278. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990801\)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990801)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o)
- Porfiriev A., Zaytseva E., Koroleva A. et al. 2018. *Baikalobia elochinensis* sp. n. (Plathelminthes, Tricladida, Continenticola), a new species of endemic Baikal planarians: morphological and genetic comparison with the type species *Baikalobia guttata* (Gerstfeldt, 1858). *Zootaxa* 4472 (3): 563–572. DOI: [10.11646/zootaxa.4472.3.8](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4472.3.8)
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M. et al. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122: 219–228. DOI: [10.1159/000167807](https://doi.org/10.1159/000167807)
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107 (2):136–140. DOI: [10.1007/s004120050289](https://doi.org/10.1007/s004120050289)
- Souza G., Vanzela A.L., Crosa O. et al. 2016. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica* 144 (2): 157–166. DOI: [10.1007/s10709-016-9886-1](https://doi.org/10.1007/s10709-016-9886-1)
- Špakulová M., Bombarová M., Miklisová D. et al. 2019. How to become a successful invasive tapeworm: a case study of abandoned sexuality and exceptional chromosome diversification in the triploid carp parasite *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Caryophyllidea: Lytocestidae). *Parasites & Vectors* 12 (161): 1–11. DOI: [10.1186/s13071-019-3420-0](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3420-0)
- Stein L.D., Bao Z., Blasiar D. et al. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology* 1 (2): E45. DOI: [10.1371/journal.pbio.0000045](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000045)
- Swain M.T., Larkin D.M., Caffrey C.R. et al. 2011. *Schistosoma* comparative genomics: integrating genome structure, parasite biology and anthelmintic discovery. *Trends Parasitology* 27 (12): 555–564. DOI: [10.1016/j.pt.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.003)
- Tasaka K., Yokoyama N., Nodono H. et al. 2013. Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *Int J Dev Biol* 57 (1): 69–72. DOI: [10.1387/ijdb.120114mm](https://doi.org/10.1387/ijdb.120114mm)
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680. DOI: [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673)
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M. et al. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res* 15 (3): 371–382. DOI: [10.1007/s10577-007-1132-3](https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3)
- Trifonov V.A., Musilova P., Kulemsina A.I. 2012. Chromosome evolution in Perissodactyla. *Cytogenet Genome Res* 137(2-4): 208–217. DOI: [10.1159/000339900](https://doi.org/10.1159/000339900)
- Trifonov V.A., Romanenko S.S., Beklemisheva V.R. et al. 2016. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes. *Chromosoma* 125 (4): 661–668. DOI: [10.1007/s00412-016-0609-2](https://doi.org/10.1007/s00412-016-0609-2)
- Vicari M.R., Bruschi D.P., Cabral-de-Mello D.C. et al. 2022. Telomere organization and the interstitial telomeric sites involvement in insects and vertebrates chromosome evolution. *Genet Mol Biol*. 45: e20220071. DOI: [10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071)
- Vítková M., Král J., Traut W. et al. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)<sub>n</sub>. *Chromosome Res* 13 (2): 145–156. DOI: [10.1007/s10577-005-7721-0](https://doi.org/10.1007/s10577-005-7721-0)
- Umylina T. M. 1971. Karyotypes of Baikal planarians of *Bdellocephala* de Man genus (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 50: 130–132. (In Russian)
- Umylina T. M. 1973. Meiotic chromosomes in planarians of the genus *Baikalobia* (Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 52 (2): 261–263
- Umylina T. M. 1976. Karyological patterns of *Baikalobia guttata* (Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 50 (7): 1087–1090
- Umylina T. M. 1977. Karyology and modern taxonomy of Baikal planarians. Ph.D. Thesis, Kazan State University, Kazan, Russia
- Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. et al. 2012. Telomeric DNA in chromosomes of five opisthorchid species. *Parasitol Int* 61 (1): 81–83. DOI: [10.1016/j.parint.2011.06.013](https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.013)
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A. et al. 2016. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One* 11 (10): e0164915. DOI: [10.1371/journal.pone.0164915](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164915)

# Внутренние теломерные последовательности в хромосомах байкальских планарий

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Королева А.Г.<sup>1\*</sup>, Евтушенко Е.В.<sup>2</sup>, Зайцева Е.П.<sup>3</sup>, Порфирьев А.Г.<sup>4</sup>,  
Тимошкин О.А.<sup>1</sup>, Кирильчик С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, 664033, Улан-Баторская, 3, Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение Российской академии наук, 630090, проспект Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Байкальский музей, Сибирское отделение Российской академии наук, 664520, Академическая, 1, Листвянка, Россия

<sup>4</sup>Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Отделение зоологии и общей биологии, 420008, Кремлевская, 18, Казань, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Наличие внутренних теломерных последовательностей в хромосомах (ITS), как правило, указывает на случаи реорганизации генома. Изменения морфологии и числа хромосом могут быть источниками внутривидового полиморфизма, а также приводить к видообразованию. У плоских червей обнаружены оба варианта, при этом ITS в хромосомах встречаются редко, что характерно и для других беспозвоночных животных. Из 23 исследованных видов плоских червей ITS были выявлены только у трех паразитических видов. С помощью FISH с теломерными зондами мы обнаружили, что ITS также присутствуют в хромосомах эндемичных байкальских планарий *Baikalobia* Kenk, 1930 (Tricladida, Continenticola, Dendrocoelidae). Это первый случай выявления ITS у свободноживущих плоских червей. Как у *Shistosoma* Weinland, 1858, появление ITS у байкальских планарий могло быть связано с процессом видообразования. Пока нет данных о ITS у других дендроцелид, и остается открытым вопрос о том, являются ли ITS специфической чертой байкальских обитателей или это особая черта всех представителей Dendrocoelidae.

**Ключевые слова:** внутрихромосомные теломерные последовательности, ITS, FISH, плоские черви, планарии, Байкал

## 1. Введение

Внутренние теломерные последовательности (ITS) – это теломерная ДНК, локализованная в любом участке хромосом, кроме терминальных регионов (Meune et al., 1990). Они могут возникать по нескольким причинам, в том числе в результате хромосомных перестроек в процессе эволюции генома, репарации двухцепочечных разрывов ДНК и внедрения экстрахромосомной теломерной ДНК в хромосомы и ее амплификации (Bolzán and Bianchi, 2006; Ruiz-Herrera et al., 2008; Bolzán, 2012). Как правило, ITS не связаны с функциями теломер, если не учитывать их определенную роль в поддержании пластичности генома, т. к. известно, что они индуцируют мутации и локализуются в хрупких сайтах, по которым происходят разрывы хромосом (Moore et al., 2018; Lin and Yan, 2008).

Выделяют четыре группы ITS: короткие, субтеломерные, слитые (появившиеся в результате слияния хромосом) и гетерохроматиновые (Bolzán,

2017). Они отличаются размерами, локализацией и нуклеотидным окружением, а также возникают благодаря разным механизмам. Короткие ITS имеют размер 100-120 пн и могут быть окружены как уникальными последовательностями, так и SINE, LINE, LTR ретротранспозонами. Длина субтеломерных ITS измеряется сотнями нуклеотидов и может включать в себя вырожденные теломерные повторы. Слитые ITS имеют ориентацию голова-к-голове и фланкированы субтеломерной ДНК, что указывает на случаи объединения двух хромосом в теломерных областях. Их размеры могут варьировать от нескольких тпн до нескольких десятков тпн. Гетерохроматиновые ITS – это самые большие последовательности размером до нескольких сотен тпн. Они часто обнаруживаются в прицентромерных областях, но могут встречаться и на плечах хромосом, а также образовывать микрохромосомы (Bolzán, 2017).

Чувствительность обычной Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) позволяет визуализировать

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [ankor-2015@yandex.ru](mailto:ankor-2015@yandex.ru) (А.Г. Королева)

**Поступила:** 26 декабря 2023; **Принята:** 05 февраля 2024;  
**Опубликована online:** 29 февраля 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



последовательности длиной 1000 пн и более (Roop et al., 1999), т.е. с помощью этого метода сложно обнаружить короткие и субтеломерные ITS. Однако наиболее значимые в эволюции кариотипа хромосомные перестройки, которые могут затрагивать теломерные регионы, этот метод способен зафиксировать. В хромосомах позвоночных животных ITS размером более 1000 пн довольно часто встречаются и расположены главным образом вблизи центромер (Meune et al., 1990; Bolzán et al., 2017; Vicari et al., 2022). Как правило, это является следствием робертсоновских транслокаций (Slijepcevic, 1998), хотя не всегда такие хромосомные мутации приводят к появлению ITS (Souza et al., 2016). Из того, что известно о хромосомах беспозвоночных животных можно сказать, что ITS размером более 1000 пн в них не так широко распространены (Vítková et al., 2005; Traut et al., 2007; Vicari et al., 2022). Например, среди моллюсков такие ITS были обнаружены только у двух из 23 исследованных в этом отношении видов (Nomoto et al., 2001; Godwin et al., 2012). Среди плоских червей известны данные FISH с теломерными зондами для 23 видов, причем большинство из них – паразиты (Таблица 1), и ITS обнаружены только в половых хромосомах двух видов трематод (Hirai, 2014) и одного вида цестод (Špakulová et al., 2019). У свободноживущих плоских червей ITS еще не были выявлены.

Мы использовали FISH с теломерными зондами для выявления локализации теломерных повторов в хромосомах двух видов эндемичных планарий рода *Baikalobia*, автохтонной группы байкальских Dendrocoelidae. ITS были обнаружены у обоих видов червей. Также в этой работе мы проанализировали филогенетические отношения плоских червей с учетом ITS в их хромосомах.

## 2. Материалы и методы

Планарии были собраны в сентябре 2011 г в заливе Листвяничный озера Байкал (51°52'02.4»N 104°49'55.2»E). Сбор осуществлялся вручную кисточкой с глубины 1 м с камней. Особи были помещены в термоконтейнер с байкальской водой и доставлены в лабораторию, где содержались до анализа. Для FISH использовались ткани двух видов эндемичного байкальского рода *Baikalobia*: *B. guttata* Gerstfeldt, 1858 и *B. variegata* Korotneff, 1912 (по три особи каждого вида). Виды, включенные в филогенетический анализ, представлены в Таблице 1.

### 2.1. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)

Хромосомные препараты готовили из гомогенизированных тканей червей. Ткани помещали в 0.56% KCl, измельчали и оставляли при 37°C на 15 мин. Затем фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1), выдерживали при +5°C 15 мин, центрифугировали, убирали надосадочную жидкость и снова повторяли процедуру три раза. На охлажденные до -20°C предметные стекла капали

суспензию клеток над водяными парами (70-80°C) и высушивали в течение 10 мин. Перед гибридизацией препараты выдерживали при комнатной температуре несколько суток.

Теломерную пробу получали безматричной ПЦР (Ijdo et al., 1991) и метили ее Bio-11-dUTP посредством ПЦР с праймерами на теломерные районы. FISH теломерной пробы на препаратах проводили в соответствии с протоколом (Joffe et al., 1998) с некоторыми изменениями. После отмывки в 1-кратном PBS, содержащем 50 mM Mg<sup>2+</sup>, препараты обрабатывали 0.12% трипсином в течение 20 с. Далее препараты фиксировали в 0.5% формальдегиде и 1-кратном PBS 10 мин, промывали в 2-кратном SSC и дегидрировали в этаноле. Гибридизационная смесь (20 мкл) содержала 50% формамид, 2хSSC и теломерный зонд. Перед гибридизацией смесь денатурировали в течение 5 мин при 96°C, охлаждали во льду и наносили на препарат. Гибридизация шла в течение ночи при 42°C. Детекция биотинилированного зонда проводилась с помощью флуоресцентно меченого стрептавидина (Streptavidin-Cy3, Sigma, США). Препараты окрашивали флуорохромом DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндол, 0.5 мкг/мл) в среде Vectashield (Vector laboratories, Великобритания) и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51. Хромосомы фотографировали при увеличении 100х (камера DP70, источник света X-Cite 120Q).

### 2.2. Филогенетический анализ

Выделение ДНК, ПЦР гена 18S рРНК и секвенирование проводились, как описано в работе Порфирьева с соавторами (Porfiriev et al., 2018). Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществлялось в программе ClustalW1.6 (Thompson et al., 1994). Филогенетическая реконструкция проводилась в программе MrBayes (3.2.7) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) при использовании модели GTR + G. Цепи Маркова (MCMC) рассчитывались в течение 1000000 поколений (4 цепи параллельно) с частотой записи параметров каждую 1000 генераций. Первые 25% генераций использовались для стабилизации метода правдоподобия, а остальные – для оценки апостериорной вероятности. Критерием достоверности служила апостериорная вероятность, превышающая 95%. Также реконструкция деревьев проводилась в пакете программ MEGA7 (Kumar et al., 2016), где использовались метод ближайших соседей (Neighbor-Joining) и дупараметрическая модель Кимуры (K2P) с бутстреп тестом (1000 репликаций). Графическая редакция дерева осуществлялась в программах FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) и MEGA7.

## 3. Результаты

### 3.1. FISH

FISH была проведена для двух видов байкальских планарий *B. guttata* и *B. variegata* (Рис. 1).



Таблица 1. Виды, проанализированные на наличие ITS, и их гены 18S рРНК

Виды	2n	ITS (FISH)	Номер в GenBank 18S rRNA
TRICLADIDA			
<i>Baikalobia guttata</i> Gerstfeldt, 1858	30	есть <sup>1</sup>	KY848668.1
<i>B. variegata</i> Korotneff, 1912	30	есть <sup>1</sup>	OR758633.1
<i>Polycelis tenuis</i> Ijima, 1884	14	нет <sup>2</sup>	Z99949.1
<i>Dugesia ryukuensis</i> Kawakatsu, 1976	14	нет <sup>2</sup>	AF050433.1 (type II)
MONOGENEA			
<i>Paradiplozoon homoion</i> Bychowsky et Nagibina, 1959	14	нет <sup>3</sup>	KY640614.1
CESTODA			
<i>Caryophyllaeus laticeps</i> Pallas, 1781	20	нет <sup>4</sup>	AJ287488.1
<i>Caryophyllaeides fennica</i> Schneider, 1902	20	нет <sup>4</sup>	KF990172.1
<i>Nippotaenia mogurndae</i> Yamaguti et Miyata, 1940	28	нет <sup>4</sup>	AJ287545.1
<i>Atractolytocestus huronensis</i> Anthony, 1958	24 (3n)	есть <sup>9</sup>	OM972659.1
TREMATODA			
<i>Schistosoma mansoni</i> Sambo, 1907	16	есть <sup>5</sup>	U65657.1
<i>S. haematobium</i> Bilharz, 1852	16	есть <sup>5</sup>	Z11976.1
<i>S. japonicum</i> Katsurada, 1904	16	нет <sup>5</sup>	Z11590.1
<i>S. sinensium</i> Pao, 1959	16	нет <sup>5</sup>	AY157225.1
<i>Clonorchis sinensis</i> Looss, 1907	14	нет <sup>6</sup>	JF823988.1
<i>Metorchis xanthosomus</i> Creplin, 1846	14	нет <sup>6</sup>	OK384552.1
<i>M. bilis</i> (Braun, 1790) Odening, 1962	14	нет <sup>6</sup>	OK384551.1
<i>M. orientalis</i> Tanabe, 1920	-	-	JF314771.1
<i>Opisthorchis viverrini</i> (Poirier, 1886) Stiles & Hassal, 1896	14	нет <sup>6</sup>	JF823987.1
<i>O. felineus</i> Rivolta, 1884 Blanchard, 1895	14	нет <sup>6</sup>	MF077357.1
<i>Bucephalus minimus</i> (Stossich, 1887) Nicoll, 1914	14	нет <sup>7</sup>	-
<i>B. australis</i> (Szidat, 1961) Yamaguti, 1971	14	нет <sup>7</sup>	-
<i>Monascus filiformis</i> (Rudolphi, 1819) Looss, 1907	18	нет <sup>7</sup>	-
<i>Cercaria longicaudata</i> Tang, 1990	16	нет <sup>7</sup>	-
<i>Bacciger bacciger</i> (Rudolphi, 1819) Nicoll, 1914	12	нет <sup>7</sup>	-
MACROSTOMORPHA			
<i>Macrostomum lignano</i> Ladurner, Schärer, Salvenmoser, & Rieger, 2005	8	нет <sup>8</sup>	FJ715306.1
ACOELOMORPHA (внешняя группа)			
<i>Hofstenia miamia</i> Correa 1960	-	-	AM701817.1

**Примечание:** 1 – получены нами; 2 - Joffe et al., 1996; 3 - Tasaka et al., 2013; 4 - Bombarová et al., 2009; 5 - Hirai et al., 2000, Hirai, 2014; 6 - Zadesenets et al., 2012; 7 - García-Souto and Pasantés, 2015; 8 - Zadesenets et al., 2016; 9 - Špakulová et al., 2019. Тире означают отсутствие информации.

Гаплоидный набор у них одинаков и составляет 15 хромосом, что было показано Т. М. Умылиной в 70-ых годах (Умылина, 1973; 1976; 1977). Из рисунка 1 видно, что повторы TTAGGG присутствуют не только на концах, но и внутри хромосом, что говорит о наличии ITS у анализируемых видов. При этом у вида *B. guttata* они располагаются в одной хромосоме (Рис. 1 с, d), а у вида *B. variegata* ITS, вероятно, они располагаются на двух разных хромосомах (Рис. 1 h).

### 3.2. Филогенетический анализ видов и ITS

Для проведения филогенетического анализа были получены нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК для *B. guttata* и *B. variegata*, для других видов плоских червей последовательности этого гена были взяты из базы данных GenBank (Таблица 1). Длина анализируемых регионов после выравнивания составила около 2000 пн. 655 информативных сайта было выявлено. В обеих программах

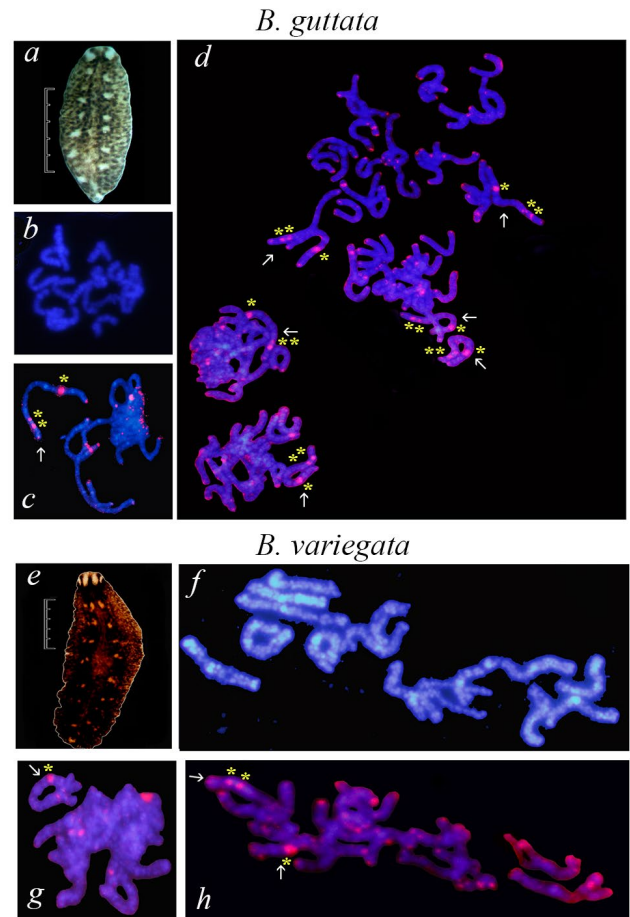
MrBayes 3.2.7 и MEGA7 были получены деревья схожей топологии. На рисунке 2 представлено филогенетическое дерево, полученное в MrBayes. В целом представители разных отрядов кластеризуются в отдельные клады с высокой статистической поддержкой, представитель Macrostromorpha образует отдельную ветвь, наряду с внешней группой *Hofstenia miamia*.

#### 4. Обсуждение и выводы

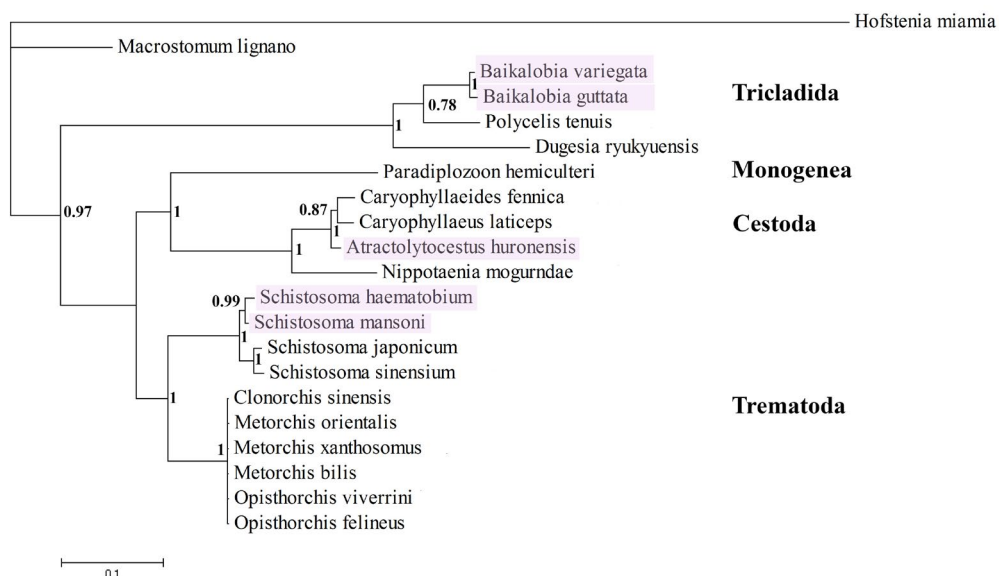
##### 4.1. ITS у паразитических и свободноживущих плоских червей

В эволюции некоторых групп животных внутри- или межхромосомные перестройки, а также геномные мутации сыграли решающую роль (Trifonov et al., 2012; 2016; Dehal and Boore, 2005). В связи с этим, отслеживание таких маркеров хромосомных мутаций как ITS позволяет оценить вклад хромосомных перестроек в видообразование.

В эволюции плоских червей также происходили многочисленные преобразования кариотипа. Также как в случае нематод и других типов беспозвоночных (Stein et al., 2003; Ghedin et al., 2007; Dubinin et al., 1936), для плоских червей отмечен значительный вклад внутривхромосомных перестроек (Swain et al., 2011), что, вероятно, связано с присутствием в их геноме большого количества повторяющихся последовательностей, в том числе LTR ретроэлементов (Grohme et al., 2018). Данные по ITS получены для небольшого числа представителей разных отрядов/классов (Таблица 1). Исходя из этих данных, можно сделать вывод о том, что для хромосом этих животных ITS не характерны, как и для других беспозвоночных. Ранее только у паразитических плоских червей были обнаружены ITS (Hirai, 2014; Špakulová et al., 2019). Обнаружение ITS в половых хромосомах паразитов, в данном случае шистосом, связано с несколькими



**Рис.1.** Теломерные сигналы (розовый) в мейотических хромосомах байкальских планарий (хромосомы окрашены DAPI, синий): a, e – внешний вид червей, шкала 1 см; b, f – 15 пар хромосом; c, d, g, h – FISH показывает теломерные повторы TTAGGG у *B. guttata* и *B. variegata*. Стрелки указывают на хромосомы с ITS. Желтыми звездочками отмечены ITS. Несколько хромосомных наборов показано на рисунке d.



**Рис.2.** Филогенетическое дерево, реконструированное по последовательностям гена 18S рРНК (MrBayes 3.2.7). Розовым цветом выделены виды с ITS. Справа приведены названия отрядов. В узлах указаны значения апостериорной вероятности. Шкала демонстрирует генетические расстояния.

инверсиями и гетерохроматизацией (Hirai et al., 2012; Hirai, 2014). Появление ITS у них было ассоциировано с распространением этих паразитов из Азии в Африку и с последующим видообразованием (Hirai, 2012). Стоит отметить, что шистосомы имеют уникальную среди гермафродитных трематод систему определения пола (ZZ самец, ZW самка), и именно половые хромосомы подверглись значительной реорганизации в процессе эволюции этого рода, о чем свидетельствуют ITS. Байкальские планарии, также как и большинство плоских червей, являются гермафродитами и не имеют отдельных гоносом. Однако появление у представителей рода *Baikalobia* ITS (Рис. 1) также могло сопровождать видообразование. У свободноживущих плоских червей часто встречаются геномные мутации, связанные с изменением числа хромосом. Они могут носить случайный характер, как в случае макростоморфы *Macrostemum lignano*, у которой был отмечен высокий процент анеуплоидов (Zadesenets et al., 2016). В случае планарий был выявлен адаптивный характер изменения числа хромосом: с увеличением широты обитания число хромосом также увеличивалось (Lorch et al., 2016). В то же время, изменение числа хромосом в процессе эволюции планарий сопровождало видообразование, например в роде *Bdellocephala*, в том числе среди байкальских представителей (Умылина, 1971; Кузнецов и др., 2000; Novikova et al., 2006). При этом происходили и изменения в морфологии хромосом, что указывает на значительную реорганизацию генома. Байкальские эндемичные планарии имеют, как правило, 30 хромосом с преобладанием в кариотипе метацентриков и субметацентриков (Умылина, 1973, 1976, 1977). Стабильность числа хромосом и редкость телоцентрических и акроцентрических хромосом у этой очень разнообразной в морфологическом и экологическом плане группы триклад может указывать на преобладание в процессе эволюции их геномов внутрихромосомных изменений, как и у других плоских червей. К сожалению, мы не знаем, имел ли общий предок всех байкальских триклад ITS в хромосомах или они появились только в процессе эволюции отдельной ветви *Baikalobia*.

## 4.2. ITS и филогения плоских червей

В самом начале эволюции плоских червей произошло важное событие, связанное с потерей центросом (Azimzadeh et al., 2012). Это сопутствовало возникновению нескольких групп плоских червей, которые сейчас объединяют в таксон Acentrosomata. Он включает четыре отряда Tricladida, Fecampiida, Prolecithophora, Bothrioplanida и три класса паразитических червей Monogenea, Cestoda и Trematoda (Egger et al., 2015; Collins, 2017). ITS были выявлены у представителей Tricladida, Trematoda и Cestoda, но отсутствовали у исследованных представителей других Acentrosomata, а также у довольно далекой кланды *Macrostomorpha* (Рис. 2), что указывает на независимость путей, приведших к появлению ITS

у свободноживущих и паразитических плоских червей. Внутри отряда Tricladida у представителей двух семейств Planariidae и Dugesidae ITS отсутствуют, но появляются в семействе Dendrocoelidae среди байкальских эндемиков (Рис.1). В Байкале встречаются представители только этого семейства.

Дальнейшее исследование ITS у представителей семейства Dendrocoelidae поможет понять, на каком этапе эволюции произошла реорганизация генома, приведшая к появлению ITS, и было ли это особенностью байкальских эндемиков или всех дендроцелид.

## Благодарности

Работа была выполнена при поддержке бюджетных проектов 0279-2021-0007 (121032300180-7) «Комплексное исследование прибрежной зоны...» and 0279-2021-0005 (121032300224-8) «Исследование трансформаций состояния водоемов...», а также грантами РФФИ №51, №12-04-32052, №13-04-01270 и №18-34-00395.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Кузнецов К.Д., Новикова О.А., Наумова Т.В. 2000. Молекулярно-генетическая типизация планарий рода *Bdellocephala* (Dendrocoelidae, Tricladida, Turbellaria) озера Байкал с оценкой видового разнообразия. Журнал общей биологии 61(3): 336–344
- Умылина Т.М. 1971. Кариотипы байкальских планарий рода *Bdellocephala* de Man (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 50: 130–132
- Умылина Т.М. 1973. Мейотические хромосомы планарий рода *Baikalobia* (Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 52 (2): 261–263
- Умылина Т.М. 1976. Кариологические особенности планарии *Baikalobia guttata* (Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 50 (7): 1087–1090
- Умылина Т.М. 1977. Кариология и современная таксономия планарий Байкала. 1977. Диссертация канд.биол. наук, Казанский Государственный университет, Казань
- Azimzadeh J., Wong M.L., Downhour D.M. et al. 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. *Science* 335 (6067): 461–463. DOI: [10.1126/science.1214457](https://doi.org/10.1126/science.1214457)
- Bolzán A.D. 2012. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 27: 1–15. DOI: [10.1093/mutage/ger052](https://doi.org/10.1093/mutage/ger052)
- Bolzán A.D. 2017. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. *Mutation Research* 773: 51–65. DOI: [10.1016/j.mrrev.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.04.002)
- Bolzán A.D., Bianchi M.S. 2006. Telomeres interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 612: 189–214. DOI: [10.1016/j.mrrev.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.12.003)
- Bombardová M., Vítková M., Spakulová M. et al. 2009. Telomere analysis of platyhelminths and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization. *Genome* 52 (11): 897–903. DOI: [10.1139/g09-063](https://doi.org/10.1139/g09-063)

- Collins J. J. 2017. Platyhelminthes. *Current Biology* 27 (7): R252–R256. DOI: [10.1016/j.cub.2017.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016)
- Dehal P., Boore J.L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology* 3 (10): e314. DOI: [10.1371/journal.pbio.0030314](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314)
- Dubin N.P., Sokolov N.N., Tiniakov G.G. 1936. Occurrence and distribution of chromosome aberration in nature (Diptera). *Nature* 137: 1035–1036
- Egger B., Lapraz F., Tomiczek B. et al. 2015. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Current Biology* 25 (10): 1347–1353. DOI: [10.1016/j.cub.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.034)
- García-Souto D., Pasantes J.J. 2015. Molecular cytogenetics in digenean parasites: linked and unlinked major and 5S rDNAs, B chromosomes and karyotype diversification. *Cytogenet Genome Research* 147 (2–3): 195–207. DOI: [10.1159/000442504](https://doi.org/10.1159/000442504)
- Ghedini E., Wang S., Spiro D. et al. 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317(5845): 1756–1760. DOI: [10.1126/science.1145406](https://doi.org/10.1126/science.1145406)
- Grohme M.A., Schloissnig S., Rozanski A. et al. 2018. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* 554 (7690): 56–61. DOI: [10.1038/nature25473](https://doi.org/10.1038/nature25473)
- Godwin R., Brown I., Montgomery S. et al. 2012. Telomere dynamics in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*): an investigation into the effects of age, tissue type, location and time of sampling. *Marine Biology* 159: 77–86. DOI: [10.1007/s00227-011-1791-7](https://doi.org/10.1007/s00227-011-1791-7)
- Ijdo J., Wells R., Baldini A. et al. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR. *Nucleic Acid Research* 19 (17): 4780. DOI: [10.1093/nar/19.17.4780](https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780)
- Hirai H. 2014. Chromosomal differentiation of schistosomes: what is the message? *Front Genet* 5: 301. DOI: [10.3389/fgene.2014.00301](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00301)
- Hirai H., Hirai Y., LoVerde P.T. 2012. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. *Parasitol Int* 61(4): 684–689. DOI: [10.1016/j.parint.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.007)
- Hirai H., Taguchi T., Saitoh M. et al. 2000. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex. *Int J Parasitol* 30: 441–452. DOI: [10.1016/s0020-7519\(99\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00186-1)
- Huelsenbeck J., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 7 (8): 754–755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1996. Ends of chromosomes in *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes) have telomere repeat TTAGGG. *Chromosome Res* 4: 323–324. DOI: [10.1007/BF02263686](https://doi.org/10.1007/BF02263686)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1998. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* 107: 173–183. DOI: [10.1007/s004120050294](https://doi.org/10.1007/s004120050294)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
- Lin K.W., Yan J. 2008. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research* 658: 95–110. DOI: [10.1016/j.mrrev.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.006)
- Lorch S., Zeuss D., Brandl R. et al. 2016. Chromosome numbers in three species groups of freshwater flatworms increase with increasing latitude. *Ecol Evol* 6 (5): 1420–1429. DOI: [10.1002/ece3.1969](https://doi.org/10.1002/ece3.1969)
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H. et al. 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10. DOI: [10.1007/BF01737283](https://doi.org/10.1007/BF01737283)
- Moore A., Dominska M., Greenwell P. et al. 2018. Genetic control of genomic alterations induced in yeast by interstitial telomeric sequences. *Genetics* 209 (2): 425–438. DOI: [10.1534/genetics.118.300950](https://doi.org/10.1534/genetics.118.300950)
- Nomoto Y., Hirai M., Ueshima R. 2001. Cloning of molluscan telomere DNA with (TTAGGG)<sub>n</sub> repeat and its chromosomal location in the freshwater snail *Biwamelania habei*. *Zoology Science* 18: 417–422. DOI: [/10.2108/zsj.18.417](https://doi.org/10.2108/zsj.18.417)
- Novikova O., Naumova T., Timoshkin O. A. 2006. Karyotypes and current approaches to the systematics of endemic Baikal representatives of *Bdellocephala* genus (Turbellaria, Dendrocoelidae). *Hydrobiologia* 568 (S):183–191. DOI: [10.1007/s10750-006-0316-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0316-8)
- Poon S.S., Martens U.M., Ward R.K. et al. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36: 267–278. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990801\)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990801)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o)
- Porfiriev A., Zaytseva E., Koroleva A. et al. 2018. *Baikalobia elochinensis* sp. n. (Plathelminthes, Tricladida, Continenticola), a new species of endemic Baikal planarians: morphological and genetic comparison with the type species *Baikalobia guttata* (Gerstfeldt, 1858). *Zootaxa* 4472 (3): 563–572. DOI: [10.11646/zootaxa.4472.3.8](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4472.3.8)
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M. et al. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122: 219–228. DOI: [10.1159/000167807](https://doi.org/10.1159/000167807)
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107 (2):136–140. DOI: [10.1007/s004120050289](https://doi.org/10.1007/s004120050289)
- Souza G., Vanzela A.L., Crosa O. et al. 2016. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica* 144 (2): 157–166. DOI: [10.1007/s10709-016-9886-1](https://doi.org/10.1007/s10709-016-9886-1)
- Špakulová M., Bombarová M., Miklišová D. et al. 2019. How to become a successful invasive tapeworm: a case study of abandoned sexuality and exceptional chromosome diversification in the triploid carp parasite *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Caryophyllidea: Lytocestidae). *Parasites & Vectors* 12 (161): 1–11. DOI: [10.1186/s13071-019-3420-0](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3420-0)
- Stein L.D., Bao Z., Blasiar D. et al. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology* 1 (2): E45. DOI: [10.1371/journal.pbio.0000045](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000045)
- Swain M.T., Larkin D.M., Caffrey C.R. et al. 2011. *Schistosoma* comparative genomics: integrating genome structure, parasite biology and anthelmintic discovery. *Trends Parasitology* 27 (12): 555–564. DOI: [10.1016/j.pt.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.003)
- Tasaka K., Yokoyama N., Nodono H. et al. 2013. Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *Int J Dev Biol* 57 (1): 69–72. DOI: [10.1387/ijdb.120114mm](https://doi.org/10.1387/ijdb.120114mm)
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680. DOI: [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673)
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M. et al. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res* 15 (3): 371–382. DOI: [10.1007/s10577-007-1132-3](https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3)
- Trifonov V.A., Musilova P., Kulemsina A.I. 2012. Chromosome evolution in Perissodactyla. *Cytogenet Genome Res* 137(2-4): 208–217. DOI: [10.1159/000339900](https://doi.org/10.1159/000339900)
- Trifonov V.A., Romanenko S.S., Beklemisheva V.R. et al. 2016. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes. *Chromosoma* 125 (4): 661–668. DOI: [10.1007/s00412-016-](https://doi.org/10.1007/s00412-016-)

[0609-2](#)

Vicari M.R., Bruschi D.P., Cabral-de-Mello D.C. et al. 2022. Telomere organization and the interstitial telomeric sites involvement in insects and vertebrates chromosome evolution. *Genet Mol Biol.* 45: e20220071. DOI: [10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071)

Vítková M., Král J., Traut W. et al. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)<sub>n</sub>. *Chromosome Res* 13 (2): 145–156. DOI: [10.1007/s10577-005-7721-0](https://doi.org/10.1007/s10577-005-7721-0)

Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. et al. 2012. Telomeric DNA in chromosomes of five opisthorchid species. *Parasitol Int* 61 (1): 81–83. DOI: [10.1016/j.parint.2011.06.013](https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.013)

Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A. et al. 2016. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One* 11 (10): e0164915. DOI: [10.1371/journal.pone.0164915](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164915)