

КОСТЫГОВ

Алексей Юрьевич

ПРОТИВОРЕЧИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДОВ В СИСТЕМАТИКЕ
ТРИПАНОСОМАТИД

03.02.11 – Паразитология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Зоологический Институт Российской академии наук

Научный руководитель:

Фролов Александр Олегович, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Скарлато Сергей Орестович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, заместитель директора по научной работе и зав. лабораторией цитологии одноклеточных организмов

Кудрявцев Александр Александрович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, старший преподаватель кафедры зоологии беспозвоночных

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова.

Защита состоится «__» _____ 2013 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01 при Зоологическом институте РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Зоологического института РАН

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Овчинникова Ольга Георгиевна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Семейство Trypanosomatidae объединяет паразитических простейших, многие из которых имеют большое практическое значение. К этой группе относятся трипаносомы и лейшмании, вызывающие тяжелые заболевания у человека и домашних животных, а также фитомонасы, которые поражают культурные растения, нанося тем самым большой экономический ущерб. За последние годы накопилось немало данных о том, что считавшиеся ранее вполне безобидными гомоксенные паразиты насекомых также при определенных условиях могут заражать человека, животных и растения.

Способность трипаносоматид расти на аксеничных средах и быстро накапливать биомассу определяет их широкое применение в качестве модельных объектов в различных областях биологии. Кроме того у этих жгутиконосцев имеется ряд особенностей, изучение которых имеет общебиологическое значение. Среди них: необычная клеточная органелла – кинетопласт, редактирование РНК, полицистронная транскрипция большинства генов, транс-сплайсинг и другие.

Традиционная система семейства основана на соотношении определенных морфотипов клеток, доминирующих в жизненном цикле жгутиконосцев, с конкретным таксоном родового уровня. В случае если один морфотип встречается у гомоксенных и гетероксенных трипаносоматид как, например, у *Leptomonas* и *Phytomonas*, для их разделения используются характеристики жизненного цикла.

В силу важности группы, трипаносоматиды одними из первых оказались в поле зрения молекулярных филогенетиков, и очень скоро выяснилось, что получаемые филограммы, категорически не соответствуют традиционной системе семейства. Так, к примеру, на данный момент, безусловно доказана полифилия четырех базовых родов гомоксенных трипаносоматид - *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* и *Leptomonas*. А вот симбионт-содержащие виды, представители которых согласно системе семейства принадлежат к трем различным родам (*Crithidia*, *Herpetomonas* и *Blastocrithidia*), формируют на молекулярных деревьях монофилетическую кладу. Ситуация усугубляется тем, что в последнее время система стала наполняться новыми таксонами выделяемыми на основе одних только данных молекулярной филогении и без какого-либо дополнительного обоснования. Создаваемая таким образом химерная конструкция уже не способна объективно отражать истинное разнообразие группы и вступает в противоречие с основными принципами биологической систематики.

Таким образом, очевидно, что систематика сем. Trypanosomatidae переживает в настоящее время глубокий кризис. Для его преодоления, прежде всего, важно понять, из-за чего возникают противоречия между традиционным морфологическим и сравнительно новым молекулярно-филогенетическим подходами в систематике трипаносоматид, и попытаться их разрешить. Анализу этих вопросов и посвящена настоящая работа.

Степень разработанности темы исследования

Тема, рассматриваемая в настоящем исследовании, неоднократно затрагивалась в литературе посвященной систематике трипаносоматид. Однако в большинстве подобных работ содержится лишь констатация факта существования противоречий между морфологическим и молекулярно-филогенетическим подходами и отсутствует подробный анализ причин. Практически нигде до сих пор не были рассмотрены возможные пути выхода из данного конфликта, вместо этого обычно предлагали отказ от использования морфологических признаков как ненадежных и построение системы только на основе молекулярно-филогенетический подхода.

Настоящее исследование было призвано восполнить пробел в изучении упомянутой проблемы и продемонстрировать преимущество комплексного рассмотрения вопросов связанных с реконструкцией филогении и созданием системы трипаносоматид.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы было исследование причин противоречий между морфологическим и молекулярно-филогенетическим подходами к созданию системы трипаносоматид и определение вероятных путей преодоления этих противоречий.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- выполнить ретроспективный анализ развития взглядов на систему трипаносоматид
- провести исследование коллекционного материала и природных изолятов гомоксенных трипаносоматид с целью расширения списка видов, включаемых в молекулярно-филогенетический анализ
- переисследовать те виды трипаносоматид, изоляция которых в культуру сопровождалась сменой морфотипов
- осуществить проверку гипотезы о монофилии цистообразующих трипаносоматид
- выполнить филогенетический анализ семейства с использованием генов 18S, 28S, мини-экзона, и HSP83
- исследовать известные примеры противоречий между современной системой трипаносоматид и результатами молекулярно-филогенетических исследований и выявить причины подобных противоречий
- определить вероятные пути преодоления противоречий между морфологическим и молекулярно-филогенетическим подходами к созданию системы трипаносоматид

Научная новизна

На светооптическом уровне исследованы природные изоляты 12 цистообразующих видов из родов *Blastocrithidia* и *Leptomonas* (в том числе 7 ранее неизвестных), а также 22 лабораторные культуры до сих пор неописанных видов трипаносоматид из коллекции Зоологического института РАН, которые были выделены его сотрудниками.

Описан один новый для науки вид (*Crithidia dedva*) и обосновано перенесение другого вида (*Leptomonas nabiculae*) в род *Herpetomonas*.

Продемонстрированы многочисленные ошибки допущенные исследователями, приводившие к несоответствию таксономического положения филогенетическому у различных видов трипаносоматид.

Обнаружено, что смешанные заражения разными видами трипаносоматид, ранее считавшиеся редким явлением, могут быть весьма частными у некоторых групп хозяев.

При помощи молекулярно-филогенетических данных подтверждена морфологическая гипотеза о монофилии цистообразующих трипаносоматид.

Предложена схема эволюции процесса формирования цистоподобных амастигот – фактически первый детально рассмотренный трансформационный ряд у трипаносоматид.

Впервые показано наличие филогенетической группы трипаносоматид, представители которой, несмотря на видимое отсутствие отличительных морфологических признаков, характеризуются редукцией редактируемого домена кинетопластного гена ND8.

Впервые проведено тестирование гена HSP83 в качестве молекулярного маркера у трипаносоматид. Показано, что реконструкция филогении по данному гену может давать значительные искажения, у отдельных видов выявлены его вероятные псевдогены.

Предложен комплексный подход к построению системы трипаносоматид.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данное исследование имеет важное теоретическое значение для изучения трипаносоматид, так как в нем продемонстрирована несостоятельность традиционной системы, предложены принципы построения новой и указаны типичные ошибки, допускаемые исследователями. Разработанные последовательности праймеров и полученные сиквенсы различных генов могут быть использованы в молекулярно-филогенетических исследованиях данной группы, а также для диагностических целей в фаунистических работах по трипаносоматидам.

Настоящее исследование проводилось в рамках рассмотрения фундаментальной проблемы соотношения различных типов данных и их применимости для систематики. Результаты проведенного анализа противоречий между морфологическим и молекулярно-филогенетическим подходами, в частности выявленные причины и предложенные пути выхода из конфликта, могут быть представлять интерес для подобных исследований в других группах эукариот. Приведенные в настоящей работе данные по особенностям эволюции белок-кодирующего гена HSP83 будут полезны для исследователей, подбирающих молекулярно-филогенетические маркеры для анализа других групп протистов. Результаты исследования также могут быть использованы в курсах лекций по протистологии для студентов биологических специальностей вузов.

Методология и методы исследования

При написании настоящей работы в методологическом плане подбирались актуальные на данный момент методы, широко применяющиеся в зоологических исследованиях. К ним относятся:

- методы сбора материала и его первичной обработки (ловля и вскрытие насекомых)
- морфологические методы, связанные с приготовлением и микроскопическим исследованием временных препаратов и мазков клеток трипаносоматид
- методы молекулярной биологии, такие как выделение ДНК, ПЦР, гель-электрофорез и секвенирование ДНК, анализ состава последовательностей и проверка их на наличие химер
- молекулярно-филогенетические методы, связанные с выравниванием последовательностей и реконструкцией филогении.

Положения, выносимые на защиту

1. Главная причина конфликтов традиционной системы трипаносоматид с результатами молекулярно-филогенетических исследований состоит в том, что эта система изначально является искусственной.
2. Новая система этой группы должна базироваться исключительно на филогенетическом подходе и согласованных между собой разных типах данных (молекулярных и фенотипических).
3. Из всех молекулярных маркеров, которые до сих пор применялись для реконструкции филогении трипаносоматид, ген 18S рРНК обеспечивает наилучшие результаты как в плане разрешения родовых и надродовых групп, так и в плане соответствия другим типам данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2006), V и VI Европейских конгрессах по протистологии (Санкт-Петербург, 2007; Берлин, Германия, 2011), Всероссийской конференции молодых ученых "Биоразнообразие и экология паразитов наземных и водных ценозов" (Москва, 2008), Международном симпозиуме "Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics" (Владивосток, 2009), Второй Московской международной конференции «Молекулярная филогенетика MolPhy-2» (Москва, 2010), Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2010). Апробация исследования была также осуществлена путем выступления автора на отчетных сессиях Зоологического

института РАН в 2004, 2005 и 2010 годах и на семинарах лаб. молекулярно-генетической систематики. Кроме того, результаты диссертационной работы были включены в Отчеты по программам президиума РАН "Происхождение и эволюция биосферы" и "Научные основы сохранения биоразнообразия России" за 2007-2012 годы. Диссертация была обсуждена на совместном заседании лабораторий молекулярно-генетической систематики и протозоологии Зоологического института РАН.

Публикации

По теме исследования опубликовано 11 работ, в том числе 3 из них – в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 разделов (Обзор литературы, Материал и методы и Результаты и обсуждение) заключения, выводов, списка литературы и приложений. Общий объем составляет 201 страницу. Работа проиллюстрирована 42 рисунками и 12 таблицами. Список литературы содержит 338 источников, в том числе 42 русскоязычных.

Благодарности

Эта работа не была бы выполнена без содействия и помощи множества людей, которых мне бы хотелось поблагодарить.

Прежде всего, я глубоко признателен моему научному руководителю А.О. Фролову за терпеливость и отзывчивость в течение всего периода подготовки диссертации. Я благодарен М.Н. Малышевой за помощь в работе с лабораторными культурами и предоставление коллекционных микроскопических препаратов, О.В. Митевой и А. А. Кузьмину за помощь в сборе материала, А.А. Добровольскому за внимание и поддержку на всех этапах подготовки работы, В.С. Лебедеву за консультации по методам филогенетического анализа, А.А. Колесникову и Д.А. Маслову за предоставление образцов ДНК трипаносоматид.

Кроме того я хочу выразить признательность Е.В. Канюковой, Д.А. Гапону и покойному И.М. Кержнеру за профессиональное определение полужесткокрылых. Также я благодарен коллективу моей лаборатории и в особенности зав. Н.И. Абрамсон за создание дружелюбной атмосферы.

Отдельно я хочу поблагодарить членов моей семьи, за веру в мои возможности, неиссякаемое терпение и воодушевление.

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке программ президиума РАН "Происхождение и эволюция биосферы" и "Научные основы сохранения биоразнообразия России".

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе рассмотрена история формирования существующей системы семейства *Trypanosomatidae*, ее современное состояние и принципы построения. Дана общая характеристика группы, включая морфологию, жизненные циклы, распространение и наличие у ее представителей генетического обмена. Проанализированы известные примеры противоречий молекулярно-филогенетических данных и традиционной системы трипаносоматид, и на основании их анализа выбраны объекты исследования. Также рассмотрены молекулярные маркеры, используемые при реконструкции филогении семейства, и обоснован выбор тех из них, которые применялись в настоящем исследовании.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Фаунистические сборы

Изучение фауны трипаносоматид полужесткокрылых проводили на материале, собранном с 2003 по 2009 год. Основная часть сборов была сделана в окрестностях ББС ЗИН РАН и МБС СПбГУ (респ. Карелия), и относительно небольшое количество насекомых было исследовано в Элисте, Казани, а также различных точках Ленинградской и Оренбургской областей. Всего было вскрыто 2753 клопа (относящихся к 68 видам из 17 семейств), из которых 523 оказались зараженными. Экстенсивность инвазии у разных видов варьировала в диапазоне от 0 до 100%.

При обнаружении трипаносоматид часть материала с предметного стекла помещали в пробирку для последующего выделения ДНК, а из оставшегося материала приготавливали тонкие мазки, которые окрашивали по Гимза для последующего изучения морфологии клеток.

2.2 Лабораторные культуры и архивные препараты

Культуры клеток трипаносоматид из коллекции ЗИН РАН, выращивали на среде ВНИ (Brain Heart Infusion) с добавлением гемина. Из культур приготавливали сухие мазки и выделяли ДНК. Клонирование клеток осуществляли на плотной среде (ВНИ+агар+гемин) путем высева капли культуры разведенной до конц. 500 кл/мл.

Всего в работе было использовано 29 лабораторных культур (морфология была изучена у 15 из них), и ДНК 5 культур отсутствующих в коллекции.

Для изучения морфологии жгутиконосцев из кишечника хозяина были использованы хранящиеся в коллекции Лаборатории протозоологии Зоологического типовые препараты *Blastocrithidia gerricola*, *B. miridarum*, *Leptomonas nabiculae*, *L. occidentalis* и изолята "Nfm2". Три архивных препарата с клетками *Leptomonas oncopelti* были использованы для выделения ДНК и последующей амплификации гена 18S рРНК.

2.3 ПЦР и секвенирование

Для амплификации и секвенирования использованных в работе генов 18S рРНК, 28S рРНК, 5S рРНК, мини-экзона, HSP83 применяли 6 опубликованных ранее так и 16 специально разработанных для настоящего исследования праймеров.

Также была предпринята попытки амплификации генов PFR1, EF1 α и топоизомеразы II, однако в связи с тем что в отношении многих важных групп трипаносоматид эти попытки были неуспешными, от этих генов пришлось отказаться.

Область ITS (ITS1-5,8S-ITS2) амплифицировали полностью или по частям. Благодаря изменчивости ПЦР-продуктов по длине оказалось возможным сравнивать образцы из фаунистических сборов между собой, а по наличию множественных продуктов судили о смешанном заражении.

Секвенирование всех образцов осуществляли напрямую на автоматическом секвенаторе ABI 3130. Полученные последовательности редактировали вручную и объединяли в контиги (общим числом более 200) в программе DNA Baser v. 2.8.

2.4 Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа в дополнение к полученным настоящей работе последовательностям, еще 117 сиквенсов были извлечены из базы данных Genbank. Выравнивание их проводили при помощи программы Muscle v. 3.8.31 и затем правили вручную в программе Bioedit 7.0.5.

Ненадежно выровненные позиции у набора данных по гену HSP83 были удалены вручную. В остальных случаях была применена программа Gblocks 0.91b.

В настоящей работе два набора данных были составными: по гену гена HSP83 (отдельные параметры для каждой из позиций кодона) и конкатенированный набор из генов мини-экзона и 5S рРНК (отдельные параметры для каждого из генов). В остальных случаях, из-за различий результирующих филогенетических реконструкций по отдельным генам объединение разных генов в составные наборы данных не производили.

Подбор моделей эволюции осуществляли в программах Jmodeltest 0.1.1 для нуклеотидных данных и Treefinder (версия марта 2011 года) для аминокислотных.

Анализ методом максимального правдоподобия проводился в программах PhyML v. 3.0, RAxML v. 7.0.4 и Treefinder в зависимости от необходимых параметров анализа. Тестирование топологий проводили методом бутстрепа с использованием 1000 реплик.

Реконструкцию филогенетических деревьев по методу Байеса осуществляли при помощи программы MrBayes 3.2.1. Проверка данных на гетерогенность паттернов замен была осуществлена при помощи Disparity index test в программе Mega v. 5.10.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика обнаруженных видов цистообразующих трипаносоматид

Всего в ходе фаунистических исследований нам удалось обнаружить семь видов рода *Blastocrithidia*, в том числе четыре ранее описанных (*B. miridarum*, *B. gerricola*, *B. inflata* и *B. raabei*), пять видов цистообразующих представителей р. *Leptomonas* (включая описанного ранее *L. jaculum*), а также *Leptomonas rigidus* у которого, согласно литературным данным также наблюдали цистоподобные амастиготы. Оказалось что этот последний вид на самом деле не является цистообразующим, однако в тех же видах клопов, которые являются хозяевами *L. rigidus*, встречается другой лептомонас, формирующий цистоподобные амастиготы в ходе жизненного цикла. Таким образом, ранее признаки этих двух видов искусственно смешивались.

В настоящей работе не удалось обнаружить существенных отличий в способах формирования цистоподобных амастигот у бластокритидий из наземных полужесткокрылых. Однако у лептомонасов отличия в процессе формирования цист были очень хорошо заметны. У одних видов цистообразование происходило в результате почкования на жгутике материнской особи, а у других – в результате равных (или почти равных) делений. Материнской особью могла быть как свободная промастигота, так и форма со жгутиком, видоизмененным в прикрепительную органеллу. Равные деления в ходе цистообразования могли осуществляться у клеток, объединенных в розетки или же у одиночных прикрепленных форм. Зрелые цисты либо сохраняли связь друг с другом, формируя группы по две, четыре или более клеток, либо располагались поодиночке.

3.2 *Blastocrithidia miridarum* и *B. gerricola*

Исследование культур KV1 и VM-33, которые до сих пор считались типовыми для *Blastocrithidia gerricola* и *B. miridarum* соответственно, показало, что в них содержатся клетки совершенно несвойственные бластокритидиям – хоано-, эндо- и брохомастиготы. Эти клетки достоверно отсутствуют в жизненном цикле *B. miridarum*, который был детально описан по результатам экспериментального заражения [Фролов, 1987]. Что касается *B. gerricola*, хотя ее жизненный цикл целиком не описан, однако известно что, как и у *B. miridarum* основным морфотипом у нее является эпимастигота, а расселительной стадией – цистоподобная амастигота, хотя процесс ее формирования происходит иначе [Фролов и др., 1997]. Таким образом, жгутиконосцы, присутствующие в так называемых типовых культурах обеих бластокритидий, не только не соответствуют диагнозу этих видов, но и не могут быть частью их жизненного цикла.

Набор морфотипов, которые встречаются в культурах KV1 и VM-33, соответствует диагнозу рода *Wallaceina*. Филогенетический анализ по генам 18S рРНК (Рисунок 1), 5S рРНК и мини-экзона подтвердил теснейшее родство жгутиконосцев этих культур со всеми описанными на данный момент представителями данного рода. Из всего этого следует, что обе обсуждаемые культуры содержат валласеин.

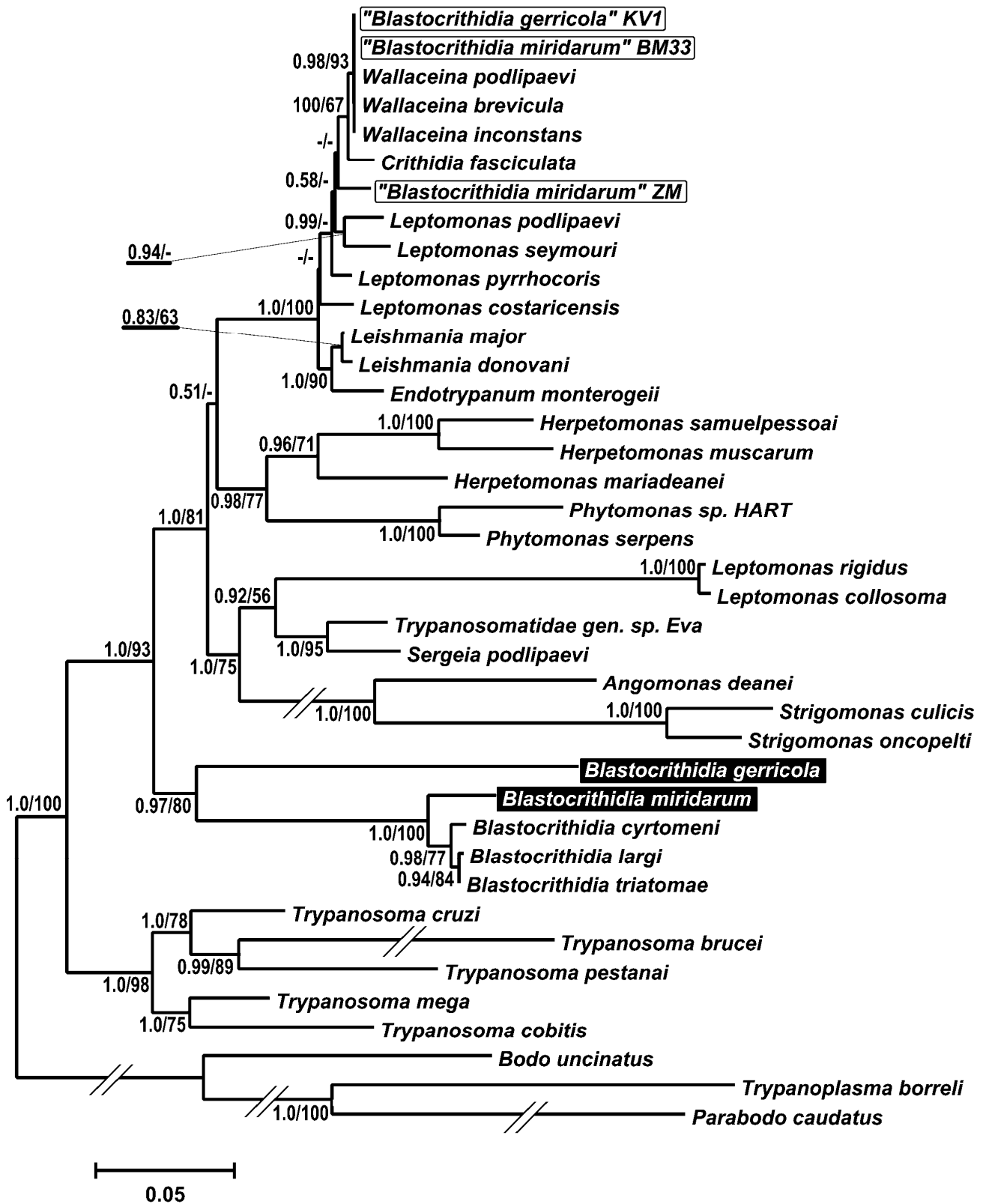


Рисунок 1 — Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены прочерками. Длина ветвей пропорциональна количеству замен. Ветви, укороченные вдвое, перечеркнуты двумя косыми чертами. Инверсией цвета шрифта и фона отмечены природные изоляты *Blastocrithidia gerricola* и *B. miridarum*, а обводкой – культуры, которые приписывались этим видам.

Филогенетический анализ, проведенный с использованием изолятов *Blastocrithidia gerricola* и *B. miridarum*, выделенных в ходе настоящей работы, продемонстрировал, что они близки к другим видам бластокритидий и значительно удалены от валласеин. Таким образом, на данный момент никакого противоречия между морфологическими и молекулярными данными в отношении этих видов не осталось.

Теперь, с учетом всех известных фактов понятно, почему такое противоречие имело место ранее. Присутствие на типовых препаратах *B. gerricola* и *B. miridarum* клеток, которые по морфологии можно отнести к валласеинам, указывает на то, что описание обоих видов было осуществлено на смешанном материале. Из литературы и из опыта настоящего исследования известно, что культивирование бластокритидий вызывает затруднения, а тех, что паразитируют в водомерках, вообще ни разу не удавалось выделить в культуру. В то же время разведение представителей рода *Wallaceina* на жидких и твердых искусственных средах осуществляется довольно легко. Отсюда вполне закономерно, что из смеси бластокритидий и валласеин, которые присутствовали в исходных изолятах, только вторые успешно размножались на искусственной среде. Полученные таким образом культуры были ошибочно идентифицированы как *B. gerricola* и *B. miridarum* и использовались под этими названиями в разнообразных исследованиях, в том числе и филогенетических. Таким образом, представления о конфликте морфологических и молекулярных данных возникли из-за того, что эти разные типы данных были получены на совершенно разном материале.

3.3 *Leptomonas nabiculae*

Мы изучили морфологию клеток в различных культурах и изолятах, выделенных из *Nabis flavomarginatus*: в исходном изоляте и в культуре Nfm2, в "типовой" культуре вида *L. nabiculae* D2, а также на типовых препаратах *L. nabiculae* и *L. occidentalis*. Морфология клеток гапантотипа *Leptomonas peterhoffi*, который был выделен из того же вида хозяина была подробно рассмотрена ранее [Мальшева, Фролов, 2009]. Кроме того нами был проведен филогенетический анализ по гену 18S рРНК с участием культур D2 и Nfm2.

Все три вида р. *Leptomonas*, описанные из *Nabis flavomarginatus* (*L. nabiculae*, *L. peterhoffi* и *L. occidentalis*) а также изолят Nfm2 характеризуются наличием сходного спектра изменчивости промастигот, как по форме, так и по размеру. Для всех этих трипаносоматид характерно присутствие трех условных размерных категорий промастигот коротких (6—10 мкм), длинных (11—22 мкм) и гигантских (более 22 мкм). Проведенный нами эксперимент по клонированию культуры Nfm2 рассеял сомнения относительно того что столь разные по длине клетки могут принадлежать к одному виду.

Культура D2 по морфологии клеток отличалась от всех этих видов. Она была представлена, по большей части, характерными для р. *Crithidia* хоаномастиготами. На типовом препарате *Leptomonas nabiculae* подобные клетки отсутствовали. Из литературы известно, что при экспериментальном заражении клетки культуры D2 располагаются у хозяина на ректальных железах [Фролов, 1986]. Так как при изоляции кишечника насекомого-хозяина ректум не всегда оказывается на препарате, подобная топологическая

приуроченность данного паразита, обусловила его отсутствие на гапантотипе, который был сделан из той же особи насекомого-хозяина, что и культура D2. Таким образом, есть все основания полагать, что эта культура была выделена из насекомого со смешанным заражением. Содержащиеся в ней организмы не имеют отношения к *L. nabiculae* и были описаны нами как самостоятельный вид другого рода *Crithidia dedva* [Костыгов и др., 2011]. Такое таксономическое положение данного вида хорошо согласуется с его филогенетической близостью к типовому виду рода — *C. fasciculata* (Рисунок 2).

У изолята Nfm2, *L. peterhoffi* и *L. occidentalis* были обнаружены весьма сходные по своим морфометрическим признакам опистомастиготы, а также эндомастиготы. На типовом препарате *L. nabiculae* эти морфотипы нам не удалось наблюдать. Вполне возможно, что, как и в случае с хоаномастиготами D2, та часть кишечника, в которой они должны были обитать, не попала на препарат. В отношении опистомастигот следует также добавить, что их доля среди общего числа клеток весьма мала, так что они могли не оказаться на мазке по случайным причинам.

На гапантотипах *Leptomonas peterhoffi* и *L. occidentalis* помимо палочковидных эндомастигот близких по размеру к опистомастиготам были еще и овальные. Их присутствие на типовом препарате *Leptomonas peterhoffi*, как было показано ранее, объясняется присутствием еще одного вида — *Wallaceina podlipaevi* [Малышева, Фролов, 2009]. То же самое, по-видимому, справедливо и для типового препарата *L. occidentalis* с тем лишь отличием, что мы не знаем, какой в данном случае вид оказался сопутствующим, так как соответствующая культура не сохранилась.

Leptomonas peterhoffi, *L. occidentalis* и *L. nabiculae*, а также изолят Nfm2 были выделены из одного хозяина (*N. flavomarginatus*) в одном и том же Северо-Западном регионе России. Вместе со всем вышеперечисленным это дает основания полагать, что эти трипаносоматиды относятся к одному виду. В связи с тем, что все три названия (*Leptomonas peterhoffi*, *L. occidentalis* и *L. nabiculae*) были опубликованы одновременно, у нас была возможность выбрать любое из них. Так как название *L. nabiculae* прежде использовали при описании ультраструктуры этого вида, мы предпочли сохранить именно его. Между тем наличие у данного паразита опистомастигот и его филогенетическое положение на дереве, реконструированном нами по гену 18S рРНК (Рисунок 2), указывают на необходимость перенесения *L. nabiculae* в род *Herpetomonas*, что и было нами сделано [Костыгов и др., 2011].

Сравнение сиквенса гена 18S рРНК культуры Nfm2, полученного в настоящей работе, с опубликованным ранее AF153043 [Merzlyak et al., 2001] показало, что последний имеет химерную природу. Начало химерной последовательности (до 226 п.н.) и ее конец (начиная с 1623 п.н.) практически неотличимы от сиквенсов *Wallaceina brevicula* и *W. inconstans* (AF153044, AF153045), но в то же время, отличаются от полученной нами. В средней части (397—1353 п.н.) оба сиквенса Nfm2 одинаковы, но отличаются от таковых у *Wallaceina*. Остальные фрагменты последовательности AF153043 консервативны для всех четырех сиквенсов. Именно химерный характер данной последовательности обусловил

неверное определение филогенетического положения культуры Nfm2 по гену 18S рРНК [Merzlyak et al., 2001], которое отличалось от того, что было определено по гену 5S рРНК.

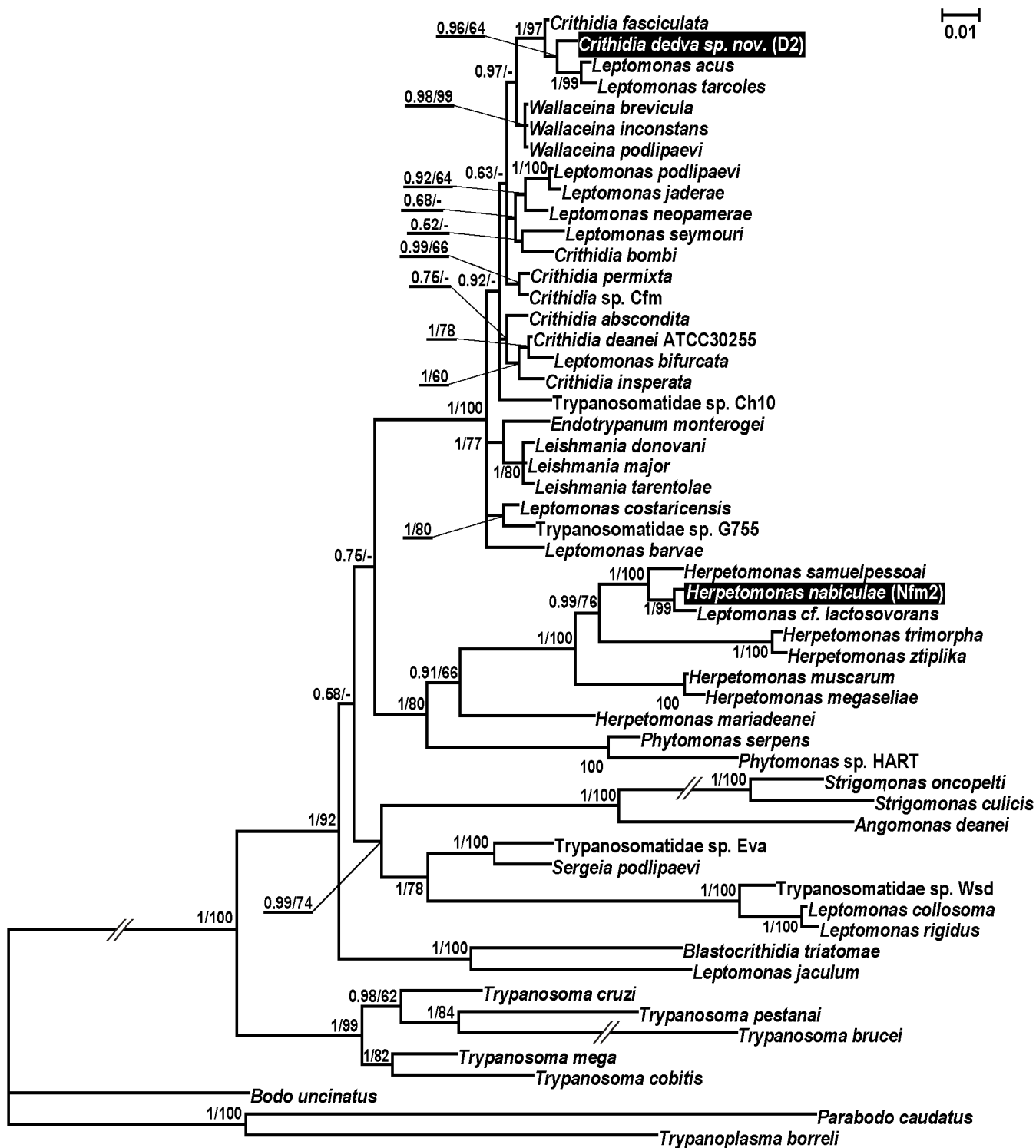


Рисунок 2 — Филогенетическое древо трипаносоматид, реконструированное по гену 18S рРНК с использованием метода Байеса. Числа в узлах обозначают Байесовы апостериорные вероятности и проценты бутстрепа (для ML) соответственно. Значения бутстрепа менее 50% обозначены прочерком. Длины ветвей даны в пропорции к количеству замен; у ветвей, перечеркнутых двойной чертой, длина сокращена вдвое. Масштабная линейка соответствует количеству замен на сайт. Виды, культуры которых исследованы в настоящем подразделе, обозначены инвертированным цветом шрифта и фона.

Таким образом, в этом подразделе удалось выявить основные причины противоречий, возникавших при изучении организмов, ранее относимых к одному виду *Leptomonas nabiculae* Podlipaev 1985. Смешанное заражение, имевшееся у насекомого-хозяина, привело к тому, что первоначально в культуру был выделен сопутствующий вид — *Crithidia dedva*. Из-за его ошибочного отождествления с *L. nabiculae* результаты исследований, которые проводились с использованием этой культуры, вводили в заблуждение относительно свойств первоначально описанного вида. Отсутствие на типовом препарате *L. nabiculae* опистомастигот явилось причиной неверного определения родовой принадлежности этого вида. И, наконец, противоречия между филогениями по разным генам были связаны с тем, что последовательность одного из них оказалась химерной.

3.4 Цистообразующие трипаносоматиды

В данном подразделе при была осуществлена проверка выдвинутой А.О. Фроловым гипотезы о единстве происхождения трипаносоматид, формирующих в ходе жизненного цикла цистоподобные амастиготы.

Результаты анализа по генам 18S и 28S рРНК, в общем, подтвердили монофилию исследуемой группы (Рисунки 3 и 4). Основная часть видов при этом подразделилась на «лептомонасную» и «бластокритидийную» подгруппы. Но возникли противоречия между двумя генами рРНК в отношении положения бластокритидий из водомерок (*B. gerricola* и *B. inflata*). По гену 18S рРНК занимали "базальное" положение в группе цистообразующих, что хорошо согласуется с морфологической кладограммой Фролова [Фролов, 1997; Подлипаев, Фролов, 2000]. По гену 28S рРНК их клада была сестринской по отношению ко всем прочим трипаносоматидам, однако это положение не было поддержано бутстреп-тестом. Это объясняется тем, что выравнивание по этому гену содержало значительно меньше информативных позиций, чем в случае гена 18S, что вкупе с эффектом притяжения длинных ветвей обусловило значительное смещение бластокритидий из водомерок в сторону корня филогенетического дерева. Данный эффект наблюдался и при использовании гена 18S, однако в значительно меньшей степени, так как сохранившийся филогенетический сигнал препятствовал распадению клады цистообразующих трипаносоматид. Между тем для существования этой клады на дереве по гену 18S рРНК оказалось необходимо присутствие бластокритидий из наземных клопов. В их отсутствие оставшиеся группы (цистообразующие лептомонасы и бластокритидии из водомерок) не могли объединиться друг с другом.

Leptomonas sp. ex Saldidae, который по данным настоящего исследования часто встречается у клопов-прибрежников наряду с *L. rigidus*, занял место среди цистообразующих лептомонасов. Между тем сам *L. rigidus*, от которого его прежде не отличали, весьма далек от указанной филогруппы. Таким образом, предположение об ошибочном объединении характеристик двух совершенно разных видов лептомонасов, которое возникло при проведении фаунистических исследований в ходе настоящей работы, нашло свое подтверждение и в результатах молекулярно-филогенетического анализа.

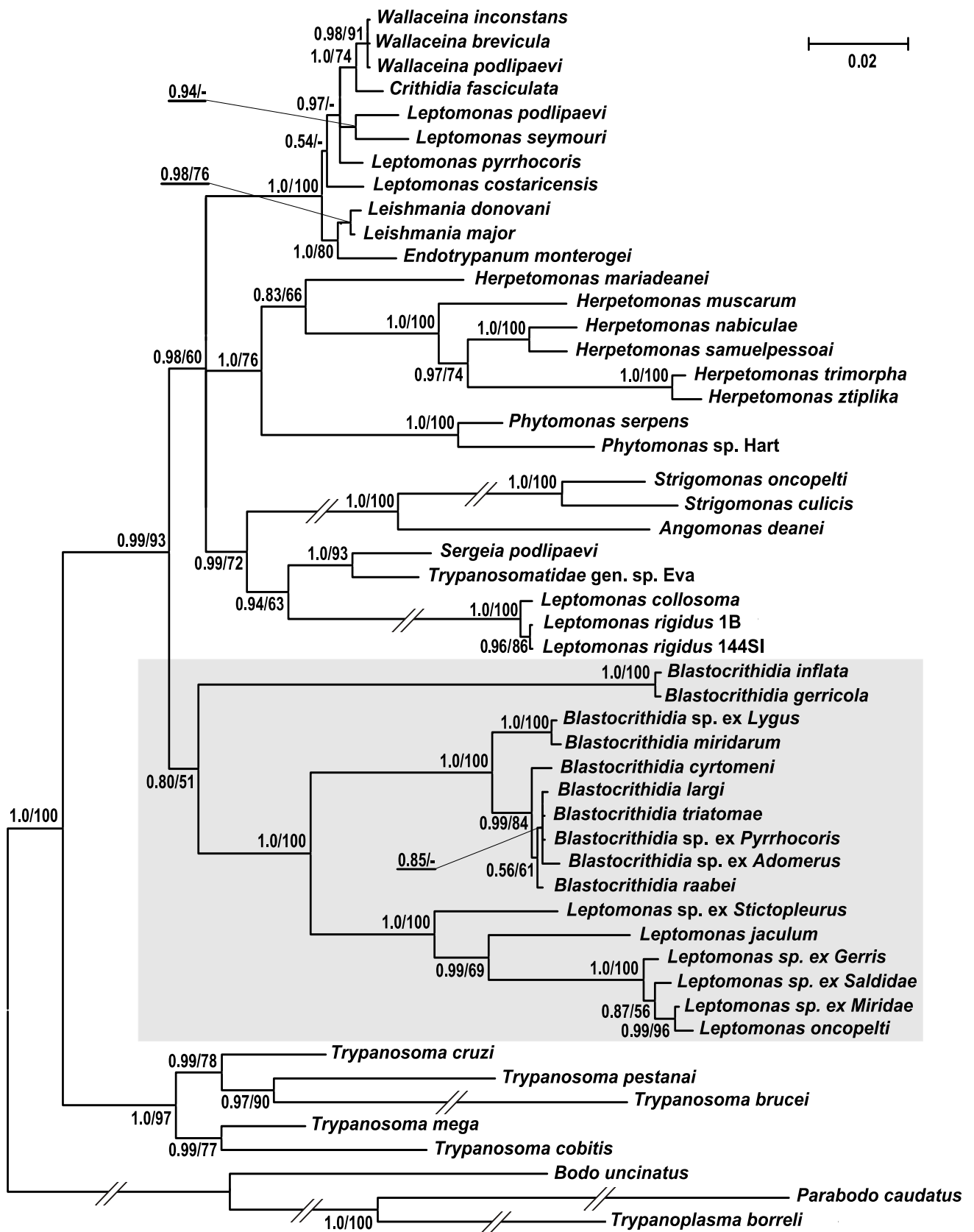


Рисунок 3 — Максимально правдоподобное дерево по гену 18S рНК. Длина ветвей пропорциональна количеству замен. Ветви, укороченные вдвое, перечеркнуты двумя косыми чертами. Значения в узлах – апостериорные вероятности и проценты бутстреп-поддержки. Значения менее 50% заменены прочерками. Группа цистообразующих трипаносоматид выделена серым цветом фона.

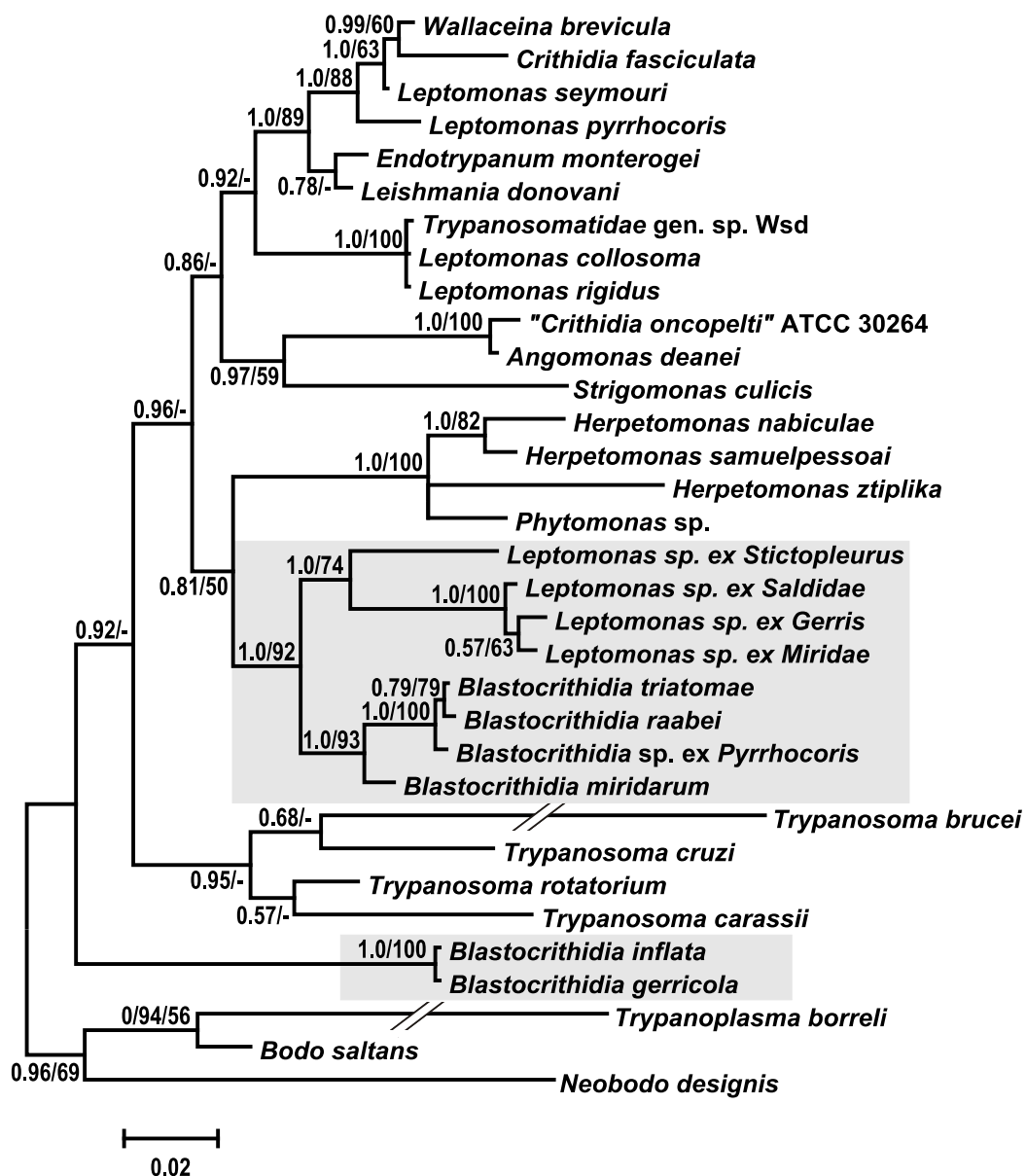


Рисунок 4 — Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 28S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены прочерками. Длина ветвей пропорциональна количеству замен. Ветви, укороченные вдвое, перечеркнуты двумя косыми чертами.

Группу цистообразующих трипаносоматид объединяет множество морфологических признаков. Прежде всего это наличие у них уникальных по своему строению цистоподобных амастигот, давших название группе. Также у всех ее представителей полностью отсутствуют элементы цитостом-фарингеального комплекса, с чем, по-видимому, связана сложность культивирования этих жгутиконосцев. Наконец, ундулирующая мембрана, которой морфологически соответствует более или менее протяженная зона десмосом между жгутиком и телом клетки, присутствует не только у бластокритидий, но и у цистообразующих лептомонасов. Однако у последних она сильно редуцирована, и располагается, в основном, внутри жгутикового кармана. У некоторых видов лептомонасов

из этой группы, как это было показано в настоящей работе, встречаются клетки с "носиком", по сути, представляющим собой сильно укороченную ундулирующую мембрану.

Таким образом, совокупность морфологических и молекулярно-филогенетических данных указывает на то, что цистообразующие трипаносоматиды – единая группа, в которой у части видов благодаря редукции ундулирующей мембраны подвижные клетки стали походить на лептомонасов.

Сравнение морфологических и молекулярно-филогенетических данных позволило оценить основные пути эволюции признаков в рассматриваемой группе. Несомненными признаками, присущими ближайшему общему предку цистообразующих трипаносоматид являются эпимастиготность, отсутствие цитостом-цитофарингеального комплекса, формирование цистоподобных амастигот в результате деления отпочковавшейся от эпимастиготы промежуточной клетки и, наконец, наличие развитого гликокаликса на поверхности цист. Первый признак ввиду его распространенности за пределами данной группы является явно симплезиоморфным. Остальные – несомненные синапоморфии, хотя второй из них совершенно независимо возник у *Phytomonas* [Фролов, 1997].

Клада, которая включает в себя всех цистообразующих трипаносоматид за исключением *B. gerricola* и *B. inflata*, вне всякого сомнения, произошла от формы, которая имела эпимастиготы, жгутиковые цисты и способность закрепляться на клетках хозяина при помощи расширенного жгутика, то есть имевшая те же признаки, что и нынешние представители группы бластокритидий из наземных клопов. Последняя, таким образом, характеризуется исключительно плезиоморфными признаками.

Ближайший общий предок цистообразующих лептомонасов выглядел, по всей вероятности, подобно современному виду *L. oncopelti*. Т.е. синапоморфными признаками для данной группы являются рудиментарная ундулирующая мембрана и редукция гликокаликса на поверхности цист. Дальнейшая эволюция цистообразования в этой группе была связана с тем что данный процесс стал осуществляться не у подвижных, а у прикрепленных форм и почкование сменилось палинтомическими делениями.

3.5 Исследование лабораторных культур

Из более чем четырех десятков культур трипаносоматид, содержащихся в коллекции лаборатории протозоологии Зоологического института РАН для настоящего исследования, прежде всего, представляют интерес те из них, что были выделены сотрудниками ЗИН. Именно по этой части коллекции (на данный момент 22 культуры), можно судить о том, какие виды из имеющихся в фауне России (и, в частности, в ее Северо-Западном регионе) могут быть культивированы в стандартных условиях.

Судя по лабораторным записям, при выделении большинства из этих культур в кишечнике хозяев наблюдались промастиготы или эпимастиготы. Однако, как показало настоящее исследование (морфологические и молекулярно-филогенетические данные), в основной своей массе эти культуры содержат представителей родов *Crithidia* и *Wallaceina*. По-видимому, здесь, как и в рассмотренных ранее случаях не обошлось без смешанных

заражений. Почти все эти культуры прежде считались представителями рода *Leptomonas* из-за того, что их морфологию внимательно не изучали. Хотя промастиготы в них и присутствуют, они не являются доминирующим морфотипом и всего лишь сопутствуют хоано-, эндо- и брохомастиготам, характерным для критидий и валласеин.

С морфологической и с молекулярно-филогенетической точки зрения валласеины являются подмножеством внутри р. *Crithidia*. Между тем все описанные виды рода *Wallaceina*, а также культуры F2, F5, F6, F7, F8, CL8, BM-33 и KV1 неотличимы по последовательностям гена 18S рРНК и мини-экзона, откуда следует, что, на самом деле, речь идет об одном единственном виде. Самостоятельность описанных видов валласеин была обоснована только их незначительными морфологическими различиями. Между тем для каждого из описанных видов данного рода существует только по одной культуре, и именно по этим культурам было произведено описание. Таким образом, признаки, отличающие эти виды, по сути, являются характеристиками индивидуальных изолятов. Суммируя все вышеизложенное, вполне закономерно отнести все культуры валласеин к единственному виду, признать вынесенный в диагноз рода признак видовым и, наконец, упразднить род *Wallaceina*.

Только у *Leptomonas* sp. PL и *Leptomonas* sp. Sld, которые были выделены, соответственно, из *Saldula pallipes* и *Salda littoralis* не содержалось никаких клеток кроме промастигот. Так что с точки зрения морфотипической концепции они являются типичными лептомонасами. И морфологически, и по последовательностям гена 18S рРНК, они неотличимы от описанного под названием *Leptomonas rigidus* ныне утраченного изолята 1В. Да и выделены были все эти культуры из одних и тех же хозяев (клопов-сальдид). Поэтому изоляты PL и Sld также должны быть отнесены к виду *L. rigidus*. Прежде филогенетическое положение культур PL и Sld по гену 5S рРНК было определено неверно, вероятно из-за кросс-контаминации образцов (они были идентичны по этим последовательностям валласеинам).

По формальным признакам несомненным лептомонасом также является выделенный А.О. Фроловым *L. pyrrocoris*, у которого помимо промастигот описаны и эндомастиготы (обозначенные авторами как амастиготы) [Фролов, 1987, Votycka et al., 2012].

Однако проведенное в настоящей работе исследование культуры Wsd из *Salda littoralis* не позволило обнаружить в ней специфических эндомастигот с петлеобразной укладкой жгутика (брохомастигот), которые следовало бы ожидать, в связи с отнесением данной культуры к р. *Wallaceina*. Нигде до сих пор не было приведено ни одной фотографии брохомастигот в культуре Wsd, скорее всего информация об их присутствии в культуре была ошибочной. Между тем разнообразием типов клеток у данной культуры выше, чем у любой другой. Здесь и "универсальные" промастиготы, и разнообразные хоаномастиготы, и опистоморфы столь характерные для симбионт-содержащих трипаносоматид и опистомастиготы, являющиеся диагностическим признаком рода *Herpetomonas* и, наконец, бесполезные для систематики гомоксенных трипаносоматид обычные эндомастиготы. Тот же

самый набор морфотипов, кстати, характерен и для полученной от чешских коллег культуры TгурX. Удивительно, что оба этих изолята, характеризующихся большим набором вариантов клеток, в филогенетическом отношении весьма близки к совершенно однообразным с точки зрения морфологии *Leptomonas rigidus* и *L. collosoma*. Ничего общего для всей этой клады с морфологической точки зрения на данный момент обнаружить не удастся, так как на ультраструктурном уровне до сих пор изучен только *L. rigidus*. Между тем данная группа характеризуется почти полной редукцией редактируемого домена гена ND8 – признак который отличает ее от все остальных исследованных в настоящее время видов семейства [Gerasimov et al., 2012].

Из двадцати двух обсуждаемых культур восемнадцать являются членами "медленно эволюционирующей клады", для которой недавно было предложено таксономическое название – Leishmaniinae [Jirků et al., 2012]. Члены этого подсемейства относятся к пяти родам (*Leptomonas*, *Crithidia*, *Wallaceina*, *Leishmania* и *Endotrypanum*), из которых, по меньшей мере, три не являются монофилетическими. Судя по многочисленным работам, посвященным исследованию разнообразию трипаносоматид, в фаунистических сборах встречается множество видов, относящихся к другим (фило)группам, однако новые виды в последние годы описываются по большей части из сем. Leishmaniinae. Ведь в настоящее время описание новых видов предполагает выделение лабораторных культур, а представители этой группы, в большинстве своем, культивируются гораздо лучше прочих трипаносоматид.

Весьма вероятно, что во всех случаях, когда наблюдалась смена морфологии клеток при их переводе в культуру на самом деле происходило замещение основного компонента инвазии минорным. Ведь при множественных пересевах медленно размножающийся вид может легко потеряться, в то время как, критидии, чья численность достигает 10^6 — 10^7 кл/мл за 3-5 дней продолжат плодиться дальше.

Как уже упоминалось выше, отождествление исходного заражения и полученной из него лабораторной культуры является источником последующих противоречий. Поэтому от исследователей требуется большая внимательность при использовании культур.

Исследование только тех видов, которые относительно легко поддаются культивированию, сильно ограничивает наши знания о разнообразии трипаносоматид. Безусловно, необходимо разрабатывать новые или адаптировать уже известные методы для "привередливых" видов трипаносоматид, так как наличие ваучерного материала весьма полезно для исследования этих объектов в самых разных областях. Однако в настоящее время при исследовании не поддающихся культивированию трипаносоматид вполне можно работать непосредственно с клетками из зараженного хозяина, ибо молекулярные методы позволяют не только идентифицировать вид паразита, но и оценить вероятность того, что заражение смешанное. Дополнительная польза от изучения таких "диких" изолятов в том, что они не успели подвергнуться искусственному отбору, который невольно осуществляется при многолетнем культивировании. При этом испытывают давление

отбора естественного, который препятствует распространению нежизнеспособных в естественных условиях мутантных форм.

3.6 Использование белок-кодирующего гена HSP83

Использование в настоящей работе гена HSP83, также часто называемого HSP90, было обусловлено успешным применением данного молекулярного маркера в работах, посвященных филогении разных групп Euglenozoa, в том числе Kinetoplastida.

В настоящем исследовании было обнаружено, что у данного гена сильно выражено смещение нуклеотидных частот, которое приводит к артефактам при построении филогении. Главным образом это смещение присутствовало в третьей позиции кодонов, и именно оно способствовало объединению в одну кладу бластокритидий из наземных клопов и водомерок. Хотя формирование данной клады и является артефактом, тем не менее, само по себе значительно повышенное по сравнению с остальными трипаносоматидами содержание АТ – нуклеотидов в третьей позиции может быть признаком, унаследованным бластокритидиями от общего предка. В пользу этого говорит и тот факт, что у части цистообразующих лептомонасов содержание А и Т также несколько выше чем у большинства прочих трипаносоматид.

Обнаруженное смещение нуклеотидного содержания в третьей позиции хорошо согласуется с ранее опубликованными исследованиями, в которых также отмечался этот феномен [Alonso et al., 1992; Alvarez et al., 1994]. Согласно их данным, суммированным по многим белок-кодирующим генам, наименьшее содержание GC – нуклеотидов было характерно для *Trypanosoma brucei*, а наибольшее – для лейшманий и *Crithidia fasciculata*. Между тем содержание GC – нуклеотидов в третьей позиции кодона гена HSP83 у бластокритидий еще ниже, чем у трипаносом. Согласно литературным данным у трипаносоматидных генов, характеризующихся высоким уровнем экспрессии, в третьей позиции кодона содержание GC нуклеотидов значительно больше, нежели у слабо экспрессирующихся генов [Alvarez et al., 1994; Horn, 2008]. Это объясняется тем что в генах с низким уровнем экспрессии используются кодоны, соответствующие более редким вариантам тРНК. Вполне возможно, что у бластокритидий сильное смещение в нуклеотидном составе гена HSP83, продуктом которого является один из шаперонов, связано с изменением активности, а, возможно, даже и функции данного гена.

Ситуация еще более осложняется наличием у *Blastocrithidia miridarum* и *B. triatomae* в последовательностях рассматриваемого гена множественных стоп-кодонов. Стоп-кодоны обычно являются одним из признаков псевдогенов. Хотя у разных групп простейших было обнаружено использование TAA, TAG и TGA кодонов в качестве значащих, однако неизвестно ни одного случая, когда бы все три использовались в таком качестве одновременно.

Таким образом, несмотря на то, что многие группы трипаносоматид, выявленные при использовании других генов, обнаруживаются и на филогенетических деревьях по HSP83, данный молекулярный маркер оказался дискредитированным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были рассмотрены противоречия, возникавшие и возникающие между традиционной системой трипаносоматид и молекулярно-филогенетическими реконструкциями, и выявлены причины их возникновения.

Наиболее важной причиной таких противоречий является методологическая несостоятельность традиционной системы. Систематика трипаносоматид сложилась в то время, когда знания об этой группе были ограничены тем, что можно было наблюдать в световой микроскоп, а в зоологической систематике все еще был широко распространен типологический подход. Однако в дальнейшем, несмотря на накопление данных по ультраструктуре, биохимии, генетике и молекулярной биологии трипаносоматид, а также возникновение новых подходов в биологической систематике, система трипаносоматид оставалась практически неизменной, как и прежде опираясь на небольшой набор светооптических признаков.

Применение методов молекулярной филогенетики должно было бы способствовать совершенствованию системы группы, предоставив возможность по-новому взглянуть на иерархию морфологических признаков. Однако несоответствия между молекулярно-филогенетическими данными и традиционной схемой классификации трипаносоматид привели к тому, что в сознании многих исследователей стало складываться впечатление о непригодности морфологии для построения естественной системы. Это дало им повод не искать способов разрешения противоречий, а классифицировать новые виды и выделять новые надвидовые таксоны исключительно на основе молекулярной филогении.

В настоящей работе была изучена группа цистообразующих трипаносоматид, которая из-за проблем с культивированием входящих в нее видов до сих пор не фигурировала в молекулярно-филогенетических исследованиях. Это единственная в семействе группа, существование которой впервые было обосновано исключительно на морфологических признаках, противоречащих традиционной морфотипической схеме классификации. Гипотеза А.О. Фролова о филогенетическом единстве цистообразующих представителей родов *Blastocrithidia* и *Leptomonas* нашла подтверждение в настоящей работе. Более того, филогения по гену 18S хорошо согласуется с морфологической кладограммой в том, что род *Blastocrithidia* оказывается парафилетическим относительно цистообразующих лептомонасов. Принципиально важно отметить, что данная гипотеза, так же, как и молекулярная филогения, идет вразрез с существующей системой. Точно так же обстоят дела и с симбионт-содержащими трипаносоматидами – филогруппой, которая поддерживается не только молекулярными, но и морфологическими признаками [Du et al, 1994; Freymuller, Camargo, 1981; Teixeira et al, 2011]. Эти примеры наглядно демонстрируют, что ограниченность традиционной системы трипаносоматид малым набором признаков, сложившимся еще на заре исследования данной группы, неминуемо должна была привести к ее дискредитации по мере накопления новых данных. Однако по иронии судьбы дискредитированными оказались морфологические признаки вообще.

Таким образом, единственным путем преодоления основного противоречия между морфологическим и молекулярным подходами в современной систематике трипаносоматид является отказ от концепции морфотипов и построение новой системы группы на филогенетической основе. При этом необходимо расширять круг анализируемых признаков, не ограничиваясь морфологией клеток, но использовать также данные молекулярной и клеточной биологии, биохимии, генетики.

Ориентированность исследований трипаносоматид на работу с культурами можно рассматривать как одну из косвенных причин противоречий между систематикой и филогенией. В случае с родом *Wallaceina* индивидуальные признаки изолятов ранее интерпретировались как видовые, поэтому видовой признак – наличие брохомастигот – был повышен в статусе до родового. Данная причина конфликта действует только в рамках морфотипической концепции и потому с упразднением последней исчезнет сама собой.

Весьма важной причиной противоречий является ошибочное отождествление видов, относящихся к разным таксономическим и/или филогенетическим группам трипаносоматид. Такая ошибка может возникнуть по причине одновременного присутствия разных паразитов в одном и том же хозяине (смешанные инвазии) или в разных особях одного вида хозяев. Как было продемонстрировано в настоящей работе, это приводило к тому, что ошибочно объединялись характеристики, принадлежащие совершенно разным видам, в результате чего формировались виртуальные химерные объекты. Из рассмотренных в настоящем исследовании примеров такое было в случаях с *Blastocrithidia gerricola*, *B. miridarum*, *Herpetomonas nabiculae* и *Leptomonas rigidus*. Дополнительным катализатором такой путаницы во многих случаях явилась традиция в обязательном порядке выделять лабораторные культуры для каждого вновь описываемого вида. Хотя в этой идее нет ничего дурного, однако стремление соответствовать данной традиции побудило некоторых исследователей выделять "типичные" культуры во что бы то ни стало даже для тех трипаносоматид, которые невозможно культивировать. В настоящее время идентификация трипаносоматид уже не представляет серьезных трудностей благодаря использованию методов молекулярной биологии. Как было показано в настоящей работе, с их помощью можно также выявлять и смешанные заражения. Именно контроль материала при помощи молекулярных методов и является путем преодоления (или, если говорить о будущем, предотвращения) противоречий, обусловленных смешанными заражениями.

Необнаружение характерных морфотипов является еще одной причиной конфликта традиционной систематики и молекулярной филогенетики трипаносоматид. Такое имело место, например, у рассмотренного в настоящей работе *Herpetomonas nabiculae*. Разумеется, данная проблема должна уйти в прошлое с отказом от морфотипической концепции, однако ввиду того, что знание о наличии морфотипов все же имеет некоторое значение, следует тщательнее исследовать доступные изоляты видов.

Среди возможных причин конфликта морфологических и молекулярных признаков, есть и такие, которые связаны со спецификой молекулярно-филогенетических исследований. Одни из них обусловлены ошибками при получении последовательностей, а

другие определяются свойствами того или иного молекулярного маркера в плане филогенетического анализа. К первой группе причин относятся создание молекулярных химер, как это было в случае с геном 18S рРНК *Herpetomonas nabiculae*, и кросс-контаминация в ПЦР, по всей вероятности, имевшая место в случае с культурами *Leptomonas rigidus* PL и Sld. Во второй группе находятся традиционные проблемы молекулярных маркеров, препятствующие реконструкции истинной филогении, такие как смещение нуклеотидного состава в изменчивых сайтах, сильное различие в темпах замен, эффект притяжения длинных ветвей, разрушение филогенетического сигнала и т.п.

Лабораторные ошибки в молекулярно-филогенетических исследованиях во многих случаях хорошо заметны по той причине, что, как правило, они приводят к противоречию между разными филогенетическими маркерами. Кросс-контаминация также приводит к появлению идентичных последовательностей у разных образцов, что не может не бросаться в глаза. К тому же практика использования отрицательных контролей в ПЦР должна минимизировать возможность подобных ошибок. Молекулярные химеры могут быть выявлены как невооруженным глазом при анализе выравнивания (если последовательности исходных вариантов имеют достаточные различия), или же с помощью специализированного программного обеспечения.

Особенности эволюции молекулярных маркеров, такие как смещение нуклеотидного состава, сильное различие в темпах замен, эффект притяжения длинных ветвей, разрушение филогенетического сигнала и пр. могут препятствовать реконструкции истинной филогении. В данной работе был обнаружен эффект притяжения длинных ветвей, который в той или иной мере был замечен на всех генах где присутствовали бластокритидии из водомерок. Меньше всего он был выражен на гене 18S рРНК. Ген HSP83, который впервые был использован для реконструкции филогении трипаносоматид именно в настоящей работе, обнаружил значительное смещение нуклеотидного состава в третьей позиции кодона, смещение аминокислотных частот и значительные различия в паттернах замен. Более того, у бластокритидий из наземных клопов полученные последовательности представляли собой псевдогены. Все эти особенности дискредитируют данный ген как филогенетический маркер. Неудивительно, что широко используемый в молекулярной филогенетике ген 18S рРНК оказался лучшим из всех использованных в настоящем исследовании молекулярных маркеров. Однако ввиду того, что даже и на нем могут сказываться некоторые артефакты, необходимо расширять круг генов применяемых для филогенетического анализа у трипаносоматид.

Проблемы с реконструкцией филогении по молекулярным данным наглядно демонстрируют необходимость контроля получаемых результатов и использование фенотипических признаков призвано сыграть здесь не последнюю роль.

Теперь, когда выявлены недостатки существующей системы трипаносоматид и определена стратегия для построения новой, необходимо приступить к ее созданию.

ВЫВОДЫ

1. Система сем. Trypanosomatidae сложилась в эпоху световой микроскопии а также доминирования типологического подхода в систематике, и с тех пор она практически не развивалась.
2. Все известные представители рода *Wallaceina* относятся к одному виду, который согласно морфологическим признакам и молекулярной филогении должен быть помещен в род *Crithidia*.
3. Представители "медленно-эволюционирующей клады", благодаря способности быстро расти на аксеничных средах, выделяются в культуры клеток чаще других трипаносоматид и в случаях со смешанным заражением способны вытеснять из культур другие виды.
4. Цистообразующие представители родов *Leptomonas* и *Blastocrithidia* составляют монофилетическую группу.
5. Из всех молекулярно-филогенетических маркеров, протестированных на данный момент, ген 18S рРНК обеспечивает наилучшее разрешение родовых и надродовых групп и в наименьшей степени провоцирует артефакты реконструкции филогении.
6. Результаты молекулярно-филогенетических исследований трипаносоматид вступают в противоречие не с морфологическим подходом как таковым, а с заложенной в основу системы этой группы концепцией морфотипов, которая ограничена небольшим количеством светооптических признаков.
7. Дополнительными причинами противоречий между молекулярными и морфологическими данными служат методические ошибки, допускаемые при работе с трипаносоматидами а также артефакты собственно филогенетического анализа.
8. Противоречия между молекулярной филогенией и существующей системой трипаносоматид принципиально неразрешимы ввиду искусственного характера последней. При разработке новой таксономии необходимо осуществлять взаимную проверку филогенетических гипотез, предлагаемых при использовании молекулярных и фенотипических признаков трипаносоматид.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Костыгов, А. Ю. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock, 1914: лептомонас или бластокритидия? / А. Ю. Костыгов, А. О. Фролов // Паразитология. — 2007. — Т. 41. — N2. — С. 126—136.
2. Костыгов, А. Ю. Исследование причин конфликта таксономии и молекулярной филогении трипаносоматид на примере *Leptomonas nabiculae* Podlipaev, 1987 / А.

Ю. Костыгов, М. Н. Малышева, А. О. Фролов // Паразитология. — 2011. — Т. 45. — № 6. — С. 409—424.

3. Gerasimov, E. S. From cryptogene to gene? ND8 editing domain reduction in insect trypanosomatids / E. S. Gerasimov, **A. Yu. Kostygov**, Shi Yan, A. A. Kolesnikov // *Europ. J. Protistol.* — 2012. — V. 48. — P. 185—193.

Работы опубликованные в других изданиях

1. Костыгов, А. Ю. Изучение разнообразия трипаносоматид полужесткокрылых в районе Белого моря / **А. Ю. Костыгов** // Материалы 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых (17-21 апреля 2006 г., Пущино). — 2006. — С. 197.
2. Митева, О. А. Филогенетическое положение *Blastocrithidia gerricola* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). / О. А. Митева **А. Ю. Костыгов** // Материалы Международной научной конференции "Биоразнообразие и экология паразитов наземных и водных ценозов" (9-11 декабря 2008 г. Москва). — 2006. — С. 232-234.
3. Костыгов, А. Ю. Биоразнообразие гомоксенных трипаносоматид в Карелии: генотипирование по рРНК / **А. Ю. Костыгов** // Материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 14-17 сентября 2010 г.). — 2010. — С. 5-7.
4. Kostygov, A. Y. Genetic diversity of insect trypanosomatids in subarctic and North-West Russia revealed by UP-PCR typing / **A. Y. Kostygov**, E. P. Slisarenko, P. A. Merkulov, S. A. Podlipaev // *Protistology.* — 2004. — Т. 3. — № 4. — P. 257—264.
5. Kostygov, A. Yu. *Leptomonas jaculum* (Leger 1902) Woodcock 1914: a leptomonas or a blastocrithidia? / **A. Yu. Kostygov**, A. O. Frolov // *Protistology.* — 2007. — V. 5. — № 1. — P. 41.
6. Kostygov, A. Yu. Reciprocal support of morphological characters and molecular data in trypanosomatid phylogeny / **A. Yu. Kostygov**, A. O. Frolov // Abstracts of the international conference "Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics" (Vladivostok, 2009) — 2009. — P. 34.
7. Kostygov, A. Yu. Cyst-forming trypanosomatids: molecular phylogeny recruits morphology to challenge taxonomy / **A. Yu. Kostygov** // Abstracts of the II Moscow international conference «Molecular phylogenetics MolPhy-2» (May 18-21, 2010, Moscow). — 2010. — С. 119.
8. Kostygov, A. Yu. Cyst-forming trypanosomatids and general issues in systematics of Trypanosomatidae family / **A. Yu. Kostygov**, A. O. Frolov // Abstracts of the VI European Congress of Protistology (Berlin, July 25-29, 2011) — 2011. — P. 79-80.