

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Зоологический институт Российской академии наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**СИМБИОНТ-СОДЕРЖАЩИЕ ТРИПАНОСОМАТИДЫ: ЖИЗНЕННЫЕ
ЦИКЛЫ, РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ АССОЦИАЦИЙ,
ФИЛОГЕНИЯ**

Ганюкова Анна Игоревна

06.06.01 – Биологические науки

03.02.11 – Паразитология

Научный руководитель

д.б.н. Фролов Александр Олегович

ЗИН РАН

Санкт-Петербург 2021

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

В настоящее время жгутиконосцы сем. *Trypanosomatidae* представляют одну из важнейших в практическом отношении групп паразитических протистов. В процессе эволюции они смогли освоить в качестве хозяев представителей всех классов позвоночных животных, кольчатых червей, насекомых и растения (Frolov et al., 2021). Многие трипаносоматиды известны как опасные патогены своих хозяев, в том числе – человека. Многочисленные факты указывают на то, что эта группа находится на «эволюционном подъеме»: в настоящее время трипаносоматиды активно осваивают новых хозяев, а вместе с ними распространяются на новые территории. Не в последнюю очередь это сопряжено с процессами трансформаций экосистем, происходящими как под влиянием нарастающего пресса антропогенных факторов, так и в связи с глобальными изменениями климата (Фролов и др., 2016). Выход трипаносоматид за границы их исторически сложившихся ареалов чреват непредсказуемыми и зачастую крайне негативными последствиями. Примером тому служит, например, диверсификация трипаносом группы «*T. brucei*», следствием которой стало распространение Африканского трипаносомоза на Американский и Азиатский континенты (Hoare, 1972; Фролов и др., 2015).

Одним из важных факторов, расширяющих адаптивный потенциал паразитов, и открывающих новые перспективы в их борьбе за ресурсы, служит их симбиоз с прокариотными микроорганизмами. В силу своей практической значимости трипаносоматиды относятся к числу наиболее интенсивно изучаемых групп протистов. Их способность формировать симбиотические ассоциации с бета-протеобактериями известна (Teixeira et al., 2011, 2013; Votýpka, et al., 2014; Kostygov et al., 2016). Между тем, ключевые вопросы, связанные с оценкой роли симбионт-содержащих трипаносоматид в формировании биоразнообразия представителей семейства, влияния симбиоза с прокариотными организмами на эволюцию сем. *Trypanosomatidae* в целом и диверсификацию его представителей в современных условиях до сих пор остаются открытыми.

Цели и задачи исследования

Цели:

- 1) Поиск симбионт-содержащих видов среди представителей семейства *Trypanosomatidae* северных широт умеренной зоны Евразии (как новых, так и описанных ранее);
- 2) Расшировка жизненных циклов симбионт-содержащих трипаносоматид.

Задачи:

- 1) Поиск симбионт-содержащих трипаносоматид среди штаммов коллекции банка культур (в т.ч. – штаммов р. *Wallaceina*) и архивных препаратов ЗИН РАН с использованием методов флюоресцентной микроскопии и молекулярного штрихкодирования;
- 2) Поиск симбионт-содержащих трипаносоматид в природных популяциях хозяев с использованием методов флюоресцентной микроскопии и молекулярного штрихкодирования;
- 2) Постановка экспериментов по искусственному заражению для изучения жизненных циклов симбионт-содержащих трипаносоматид;
- 3) Оценка гостальной специфичности симбионт-содержащих видов трипаносоматид.

Научная новизна работы

Представленная работа является первым широкомасштабным исследованием разнообразия симбиотических ассоциаций трипаносоматид с прокариотными цитобионтами на севере Евразии и оценки роли таких ассоциаций в эволюции сем. Trypanosomatidae. До последнего времени симбиоз с бета-протеобактериями рода *Ca. Kinetoplastibacterium* считался уникальным событием в эволюционной истории трипаносоматид, с которым связывалось происхождение подсем. Strigomonadinae. Обнаружение альтернативной симбиотической ассоциации (*Novymonas esmeraldas*/*Ca. Pandoraea novymonadis*) у представителя подсем. Leishmaniinae ставит под сомнение такое утверждение и делает вероятной гипотезу, согласно которой симбиотические ассоциации с прокариотными организмами могут возникать независимо у представителей разных таксонов трипаносоматид, и имеют при этом различные эволюционные последствия. Существующие взгляды на происхождение и разнообразие симбиотических ассоциаций трипаносоматид и прокариотных цитобионтов во многом искажены за счет исторически сложившегося «ассиметричного» изучения группы. В данной работе рассматриваются 3 основные проблемы, с которыми это связано. Первой проблемой является многолетняя фокусировка исследований группы на организмах, которые имеют важное практическое значение – представителях двух диксенных родов *Leishmania* и *Trypanosoma*. Моноксенные паразиты насекомых и диксенные паразиты растений, разнообразие которых значительно больше, при этом всегда находились в тени «топовых представителей» группы. Предлагаемое решение данной проблемы – это целенаправленный поиск симбионт-содержащих видов среди представителей всех родов моноксенных трипаносоматид и диксенных паразитов растений. Вторая проблема –

исторически исследование моноксенных трипаносоматид было связано преимущественно с изучением паразитов полужесткокрылых насекомых. При этом значительный сегмент фауны трипаносоматид из двукрылых насекомых исследован крайне фрагментарно. Тем не менее, примерно четверть банка культур из коллекции ЗИН РАН представлена штаммами жгутиконосцев – паразитов двукрылых насекомых. И наконец, основное внимание исследователей на протяжении длительного времени было сосредоточено на изучении фауны трипаносоматид из тропических и субтропических областей Старого и Нового Света. Так, все известные симбионт-содержащие виды трипаносоматид описаны из насекомых Южной и Центральной Америки. Этот факт может иметь двойное толкование. Либо происхождение и распространение симбиотических ассоциаций трипаносоматид ограничено поясом тропиков и субтропиков Нового Света, либо такие ассоциации не были до сих пор найдены в других областях. Для решения этой проблемы мы планируем изучение биоразнообразия трипаносоматид, выделенных из насекомых бореальной зоны Европы (от Карелии до Камчатки)

Решение перечисленных выше проблем впервые позволит объективно оценить многообразие и значение симбиотических ассоциаций с прокариотами в эволюции представителей сем. Trypanosomatidae.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 7 работ в печатных изданиях. Из них 7 – статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 6 статей в журналах, индексируемых SCOPUS и 4 статьи в журналах, индексируемых Core Collection WoS.

Так же были опубликованы 5 тезисов конференций. Результаты работы представлены и обсуждены на 1 всероссийской конференции с международным участием и 4 международных конференциях.

Теоретическое и практическое значение работы

Оценка разнообразия симбиотических ассоциаций с прокариотами и их роли в эволюции и диверсификации трипаносоматид имеет большое значение. На настоящий момент наука располагает двумя доказательствами того, что симбиоз с бета-протеобактериями может приводить к возникновению новых филогенетических линий трипаносоматид. Таковы группа родов, объединяемых в подсем. Strigomonadinae и недавно описанный ближайший родственник лейшманий *Novymonas esmeraldas*. Каждая из этих ассоциаций включает уникального прокариотного партнера из неродственных таксонов бета-протеобактерий.

Результатом данной работы является доказательство гипотезы, предполагающей, что симбиоз с прокариотными организмами не исключение из правил, а один из значимых

эволюционных трендов сем. Trypanosomatidae. По всей видимости, симбиотические ассоциации с прокариотными организмами могут возникать независимо у представителей разных таксонов трипаносоматид и иметь при этом различные эволюционные последствия.

Выявлены и изучены неизвестные ранее новые формы таких симбиотических ассоциаций на севере Евразии, что, учитывая исключительную важность трипаносоматид как потенциальных патогенов человека, имеет большое прикладное значение.

Материалы и методы

- Сбор и вскрытие насекомых

Сбор насекомых проводился на протяжении полевых сезонов 2016-2020 гг. на территориях Ленинградской, Новгородской, Псковской областей, респ. Карелия, Коми, Ямало-Ненецком АО, Чукотском АО и Камчатском крае (таб. 1). Насекомых усыпляли в парах хлороформа, после чего вскрывали в капле физиологического раствора и изолировали кишечник. Фрагменты кишечника и его содержимое изучали на прижизненных препаратах, и при обнаружении инфекции препарат использовали для приготовления сухого мазка.

Всего было произведено 1347 вскрытий (из них – 618 насекомых из отр. Diptera, 513 насекомых из отр. Hemiptera, 112 насекомых из отр. Coleoptera, и 104 насекомых из других отрядов).

Таб. 1. Основные регионы сбора насекомых.

Ленинградская обл.	Пос. Высокоключевской	59°47' с. ш., 30°08' в. д.
	Пос. Комарово	60°11' с. ш., 30°48' в. д.
	Зак-ник Раковые озёра	60°36' с. ш., 29°20' в. д.
Новгородская обл.	Дер. Оксочи	58°39' с. ш., 32°47' в. д.
Псковская обл.	Дер. Ляды	58°35' с. ш., 28°55' в. д.
Респ. Карелия	О-в Средний (ББС СПбГУ)	66°17' с.ш., 33°38' в. д.
	ББС Картеш	66°20' с. ш., 33°38' в. д.
Респ. Коми	Пос. Воргашор	67°35' с. ш., 63°47' в. д.
Ямало-Ненецкий АО	Ст. Сось	67°06' с. ш., 65°61' в. д.
Чукотский АО	Пос. Угольные копи	64°45' с. ш., 177°41' в. д.
	Пос. Провидения	64°24' с. ш., 173°11' в. д.
	Ст. Чаплино	64°24' с. ш., 172°14' в. д.
Камчатский край	Село Усть-Хайрюзово	57°07' с.ш., 156°64' в. д.

- **Культивирование трипаносоматид**

Фрагменты кишечника, заражённые трипаносоматидами, помещали в пробирки со средами для культивирования Brain Heart Infusion (BHI, Difco), Sneider's Medium или M199 с добавлением гемина (25 мкг/мл) и антибиотиков бензилпенициллина из расчета 500 ед./мл и стрептомицина 500 мкг/мл. Впоследствии культуры жгутиконосцев были очищена от сопутствующих организмов в М-образных трубках (Подлипаев, Фролов, 1987). Всего таким образом было получено 236 оригинальных культур.

Аксеничные культуры трипаносоматид поддерживаются в банке культур ЗИН РАН (Malysheva et al., 2016) на лабораторных средах без раствора антибиотиков при температуре 22°C, с пересевом раз в 14 дней. Часть культур в настоящий момент подверглась криоконсервации.

- **Световая микроскопия**

Мазки культур и фрагментов кишечника высушивали, фиксировали 96% этанолом в течение 30 минут и окрашивали по Романовскому-Гимза (рН 6.8) 25 минут. Микрофотографии получены на микроскопе Leica DM 2500, объектив HCX PL FLUOTAR 100X, с 14 Мпс USB камерой UCMOS14000KPA (Tour Tek, Hangzhou, China). Все измерения клеток и статистический анализ выполнены с помощью программы UTHSCSA Image Tool for Windows v.3.0.

- **Флюоресцентная микроскопия**

Для визуализации цитоплазматических бактерий-симбионтов и ДНК-содержащих органелл проводили окраску флюоресцентным красителем DAPI. 200 мкл культуры, достигшей концентрации 1×10^5 кл/мл, осаждали центрифугированием (3000 об/мин). Надосажочную жидкость сливали, после чего фиксировали клетки 4% раствором формальдегида в течение трёх минут. Затем клетки жгутиконосцев снова осаждали центрифугированием, а осадок промывали 0,1 М фосфатным буфером для удаления остатков формалина. После данной процедуры клетки переосаждались, и осадок окрашивался раствором флюоресцентного красителя DAPI (1 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере в течение 15 минут. Для удаления избытка красителя осадок промывали три раза в 0,1 М фосфатном буфере.

Свежие мазки содержимого заражённых фрагментов кишечника насекомых проводили через аналогичные стадии пробоподготовки (фиксация 4% раствором формальдегида, промывка 0,1 М фосфатным буфером, окрашивание DAPI 1 мг/мл в 0,1 М фосфатном буфере в течение 15 минут). Все процедуры осуществлялись на предметном стекле.

Изучение препаратов проводилось на флюоресцентном микроскопе Leica DM 2500. Микрофотографии получены с использованием 14 Мпс USB камеры UCMOS14000KPA (TOUPCAM).

- Электронная микроскопия

Для исследований в электронном микроскопе культуры жгутиконосцев, предварительно очищенные от сопутствующих организмов, осаждали центрифугированием (3000 об/мин), надосадочную жидкость сливали, а осадок фиксировали 1,5% глутаральдегидом на 0,1 М какодилатном буфере (1 час), после чего клетки промывали в 0,1 М растворе какодилатного буфера с последующей постфиксацией 2% раствором OsO₄ в какодилатном буфере в течение 30 минут. Затем материал обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и ацетоне и заключали в смесь аралдита с эпоном. Срезы получали на ультрамикротоме Leica UC-6, окрашивали водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца и просматривали в микроскопе Mira Teskan (FEI Company). Для сканирующей электронной микроскопии фиксированный и обезвоженный материал, нанесенный на стёкла с полилизинным покрытием, обрабатывали в сушилке с критической точкой HCP-2 (Hitachi Ltd., Токио, Япония) и после покрытия 20-нм слоем платины в устройстве для нанесения покрытия IB-5 Ion (Giko Co. Ltd., Токио, Япония) была исследована под микроскопом Tescan Mira3 LMU с напряжением 25,00 кВ.

- Выделение геномной ДНК, ПЦР и очистка фрагментов из ПЦР-смеси

Геномная ДНК была выделена из культур и фрагментов заражённого кишечника насекомых при помощи набора для выделения ДНК PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen). Фрагмент гена COI насекомых амплифицировали для идентификации видовой принадлежности хозяина при помощи пары праймеров LCOI and HCOI в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Cywinska, 2010). Фрагмент гена 18S трипаносоматид амплифицировали при помощи специфичной пары праймеров S762-S763 (Kostygov et al., 2014). Протокол амплификации и состав реакционной смеси описаны ранее (Костыгов, Фролов, 2007). Фрагмент гена 16S бактериальных симбионтов трипаносоматид (из аксеничных культур) амплифицировали при помощи специфичной праймеров 680F-1486R (Teixeira et al., 2011). Полученные ПЦР-фрагменты выделяли из реакционной смеси и очищали с использованием набора Cleanup Standard (Евроген).

- Филогенетический анализ

Выравнивание последовательностей гена 18S рРНК трипаносоматид, представляющих известные филогруппы, было подготовлено с использованием программного пакета MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 5.05, Tamura et al., 2011, www.megasoftware.net) (Schwarz et al., 2014), при этом неоднозначно выровненные позиции в обрезанном выравнивании удалялись вручную. Для анализа были

использованы как доступные в GenBank последовательности гена 18S рРНК., так и полученные в ходе работы последовательности. Анализы проводились в PhyML v.3.0.1 (Guidon and Gascuel 2003) и MrBayes v.3.2.2 (Ronquist et al. 2012) с оптимизацией модели в ModelTest v.3.06. Общая модель обратимого во времени замещения со смешанной моделью для вариации скорости среди сайтов (GTR + Γ + I) была выбрана как наиболее подходящая модель эволюции последовательности. Анализ начальной загрузки включал эвристический поиск с 1000 повторениями (максимальная вероятность). Байесовский анализ выводов проводился для пяти миллионов поколений с коварионами и выборкой каждые 100 поколений. Все остальные параметры были оставлены в значениях по умолчанию.

- Экспериментальные заражения

- Культивирование насекомых.

- В качестве экспериментального хозяина мы использовали культуры мух *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Protophormia terraenovae*, которые в течение многих лет содержатся в Лаборатории биофармакологии и иммунологии насекомых СПбГУ. Насекомые были любезно предоставлены Несиным А. П.

- Содержание и заражение личинок

- Личинки мух *L. sericata* и *C. vicina* содержались в стеклянных банках объёмом 1л, закрытых марлей для аэрации, на кусочках говяжьей печени, при температуре 22° С и режиме 16L/8D. В качестве субстрата использовали влажные опилки (Vinogradova and Reznik, 2013).

- Для заражения личинок помещали на полужидкий субстрат, основу которого составляла смесь для детского питания «Пюре ФрутоНяня из говядины» (АО «ПРОГРЕСС»), к которой в соотношении 3:1 добавляли культуру жгутиконосцев *A. deanei*. Заражение проводили по двум схемам: (1) при кратковременном заражении однодневных личинок в течение суток содержали на заражённом субстрате; (2) при длительном непрерывном заражении однодневных личинок помещали на заражённый субстрат, который обновляли ежедневно до момента пупаризации насекомых.

- Содержание и заражение имаго

- Имаго *L. sericata* и *C. vicina* содержали в пластиковых садках Д 10 х В 15 х Ш 7 см с перфорированной крышкой при температуре 22° С и режиме 16L/8D (Vinogradova and Reznik, 2013). В садок помещали кусочек сахара для питания насекомых и поилку с водой.

- Непосредственно перед заражением насекомых в течение суток содержали без пищи и воды. Далее муху помещали в отдельную чашку Петри диаметром 35 мм, куда добавляли 15 мкл культуры *A. deanei* (3×10^8 кл/мл). После того, как муха заканчивала пить,

при помощи дозатора измеряли объём оставшейся капли. В среднем объём выпитой мухами жидкости составлял около 5 мкл. Момент, когда муха заканчивала пить, определялось как точка отсчёта с момента заражения.

Продолжительная иммобилизация мух

В рамках эксперимента по выявлению продолжительности инвазии часть мух после одноразового заражения помещали в пластиковые трубки (Kostygov et al., 2020). Переднее отверстие трубки было закрыто сеткой с ячейей ~ 1 мм. Размер ячеей позволял насекомому вытягивать хоботок и получать питание в виде 15% сахарного сиропа из наружной поилки. Поилка с сахарным сиропом обновлялась ежедневно. Задняя часть трубки с мухой затыкалась куском ваты, которая не позволяла мухе перемещаться вдоль продольной оси трубки и впитывала фекалии насекомого. Смена ваты производилась ежедневно.

В трубках перемещение насекомых было ограничено, что исключало возможность автоинвазии мух через собственные фекалии.

Внутривидовая трансмиссия паразита между имаго

Для изучения передачи инфекции к 5 незаражённым имаго подсаживали заражённую муху того же вида (*L. sericata* или *C. vicina*). Всех насекомых вскрывали через 3 суток. Каждая линия эксперимента включала несколько повторностей (см. результаты).

Межвидовая трансмиссия паразита между имаго

Мы протестировали межвидовую передачу между имаго. К 5 неинфицированным мухам подсаживали 3 мухи другого вида (последние ранее были инфицированы *A. deanei*) и содержали в одном контейнере в течение 5 суток. Всех насекомых препарировали и проверяли на наличие трипаносоматид с помощью световой микроскопии спустя 5 дней совместного проживания. Мы выполнили 6 повторностей для перекрестных инфекций в линии «*C. vicina* x *L. sericata*» (всего 30 мух неинфицированной группы для каждого вида) и 3 повтора для перекрестных инфекций в линии «*L. sericata* x *P. terraenovae*» (всего 15 особей незараженных мух каждого вида).

Результаты и обсуждение

1. Поисковые работы

- **Результаты**

Работы по поиску симбионт-содержащих трипаносоматид среди представителей сем. Trypanosomatidae велись в двух основных направлениях: (1) поиск в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН с применением методов флуоресцентной микроскопии и молекулярного штрихкодирования; (2) поиск среди природных заражений с применением аналогичных методов.

Поиск новых симбионт-содержащих видов в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН

Всего в ходе исследования мы проанализировали 74 штамма трипаносоматид, которые хранятся в банке культур ЗИН РАН и 46 гистологических мазков из коллекции архивных препаратов.

1. Род *Wallaceina*. В банке культур ЗИН РАН хранятся аксеничные культуры 4 штаммов, принадлежащих к р. *Wallaceina*: *W. ravinae*, *W. collosoma*, *W. rigidus* и штамм WSD. Нам не удалось выявить наличие прокариотных симбионтов у вышеперечисленных штаммов посредством амплификации бактериального гена 16S рРНК, который является основным маркером для молекулярного штрихкодирования эндосимбионтов трипаносоматид.

Анализ этих изолятов с применением методов флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI) так же не позволил визуализировать каких-либо ДНК-содержащих органелл в клетках исследованных изолятов, кроме ядра и кинетопласта (рис. 1 А, С).

Так же не удалось обнаружить симбионт-подобные структуры на электронограммах этих трипаносоматид. Тем не менее, исследованные нами жгутиконосцы р. *Wallaceina* имеют ряд морфологических особенностей, сближающих их со стригомонадами. Мы обнаружили редуцированный парафлагеллярный тяж и относительно рыхлый кинетопласт. Субпелликулярный слой микротрубочек валласемонасов нерегулярный, в нём имеются бреши с заходящими в них ветвями разветвлённого митохондрия (рис. 1 В, D).

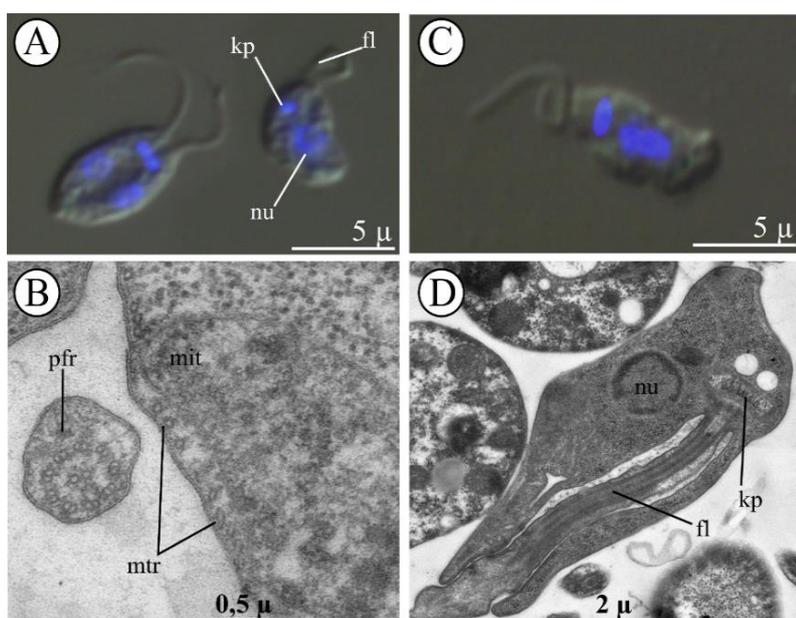


Рис. 1. Морфология жгутиконосцев р. *Wallaceina* в культуре. А – промастиготы штамма WSD (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); В – ультраструктура клеток штамма WSD (ТЭМ); С – промастигота *Wallaceina collosoma* (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); D – ультраструктура клеток штамма *Wallaceina collosoma* (ТЭМ).

fl – жгутик; kp – кинетопласт; mit – митохондрия; mtr – микротрубочки субпелликулярного слоя; nu – ядро; pfr – редуцированный парафлагеллярный тяж.

2. *Vickermania (Leptomonas) repentinus*. Нами также был выполнен анализ архивных препаратов трипаносоматид из коллекции ЗИН РАН. Всего были изучены 96 сухих мазков, окрашенных по Гимза. Этот метод позволил выявить симбионт-подобные тела в клетках трипаносоматид, ранее описанных как *Leptomonas repentinus* (Малышева, Фролов, 2002).

Клетки на мазках представлены продолговатыми промастиготами, имеющими 1 или 2 длинных выраженных жгутика (рис. 2 А, В). В последнем случае жгутики гетероморфны по длине, и либо плотно прикрепляются друг к другу латеральными сторонами (рис. 2 А), либо свободны (рис. 2 В). Кинетопласт очень крупный, расположен в передней части клетки. У небольшой части клеток (~10%) помимо ядра и кинетопласта мы отмечаем крупную, интенсивно окрашенную структуру, которая занимала постнуклеарное положение.

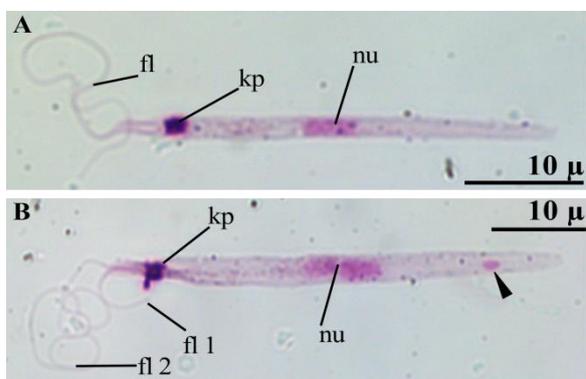


Рис. 2. Промастиготы *Leptomonas repentinus* в культуре (мазки, окраска по Гимза-Романовскому).

fl – жгутик, fl 1 – короткий жгутик, fl 2 – длинный жгутик, kp – кинетопласт, nu – ядро. Стрелкой указано симбионт-подобное тело.

Поиск симбионт-содержащих изолятов трипаносоматид в природных популяциях хозяев на севере России

Мы проанализировали 236 новых изолятов трипаносоматид, полученных из природных заражений насекомых в ходе полевых исследований 2016-2020 гг, с использованием фрагмента гена 18 S рРНК. Результаты молекулярного штрихкодирования позволили нам выявить 3 новых изолята, последовательности которых идентичны ранее описанным видам симбионт-содержащих трипаносоматид (таб. 2) (рис. 3).

Последовательности изолятов MN и Chr 51 были полностью идентичны последовательностям *A. deanei*, а последовательность изолята M29 совпала с сиквенсом *A. desousa* депонированным в систему GenBank.

Анализ гистологических мазков позволил нам выявить ещё одну симбиотическую ассоциацию среди природных заражений. Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI показало множество небольших (около 20) ДНК-содержащих бактериоподобных телец, расположенных преимущественно в постнуклеарной части клетки у фитомонады из

клопа *Picromerus bidens*. Впоследствии новый вид был описан нами как *Phytomonas borealis* (см. ниже).

Таб. 2. Симбионт-содержащие изоляты, полученные в ходе полевых работ 2016-2020 гг.

Изолят	Хозяин	Регион
<i>Angomonas deanei</i> MN	<i>Lucilia sp.</i> (Diptera: Calliphoridae)	Пос. Комарово, Ленинградская обл. (60°11' с. ш., 30°48' в. д.)
<i>Angomonas deanei</i> Chr59	<i>Calliphora terraenovae</i> (Diptera: Calliphoridae)	Село Усть-Хайрюзово, Камчатский край (57°07' с.ш., 156°64' в. д.)
<i>Angomonas desousai</i> M29	<i>Calliopum elisae</i> (Diptera: Lauxaniidae)	Дер. Ляды, Псковская обл. (58°35' с. ш., 28°55' в. д.)

- Обсуждение

Поиск новых симбионт-содержащих видов в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН

Трипаносоматиды р. *Wallaceina* представляли для нас значительный интерес в начале наших исследований по двум основным причинам: (1) на ранее опубликованных филогенетических деревьях эти жгутиконосцы как правило занимали сестринское положение по отношению к кладе, объединяющей симбионтсодержащих трипаносоматид подсем. Strigomonadinae (Kostygov et al., 2014); (2) во-вторых, у одного из ранее описанных видов («*Leptomonas rigidus*») было показано наличие септированной тубулеммы – признака, считающегося одной из основных синапоморфий симбионтсодержащих стригомонадин (Фролов, Подлипаев, 1996). Однако ни одна из использованных нами методик не позволила выявить присутствия бактериальных симбионтов в цитоплазме 4 штаммов трипаносоматид, относящихся к р. *Wallaceina*.

В последние годы положение р. *Wallaceina* на филогенетических деревьях претерпело значительные изменения, что в большой степени связано с описанием новых родов и включением последовательностей новых видов на филогенетические схемы (рис. 3.3) (Votýpka et al., 2020; Lukeš et al., 2021). По всей видимости, валласемонасы гораздо ближе к кладе, которая так же включает pp. *Sergeia* и *Vickermania*.

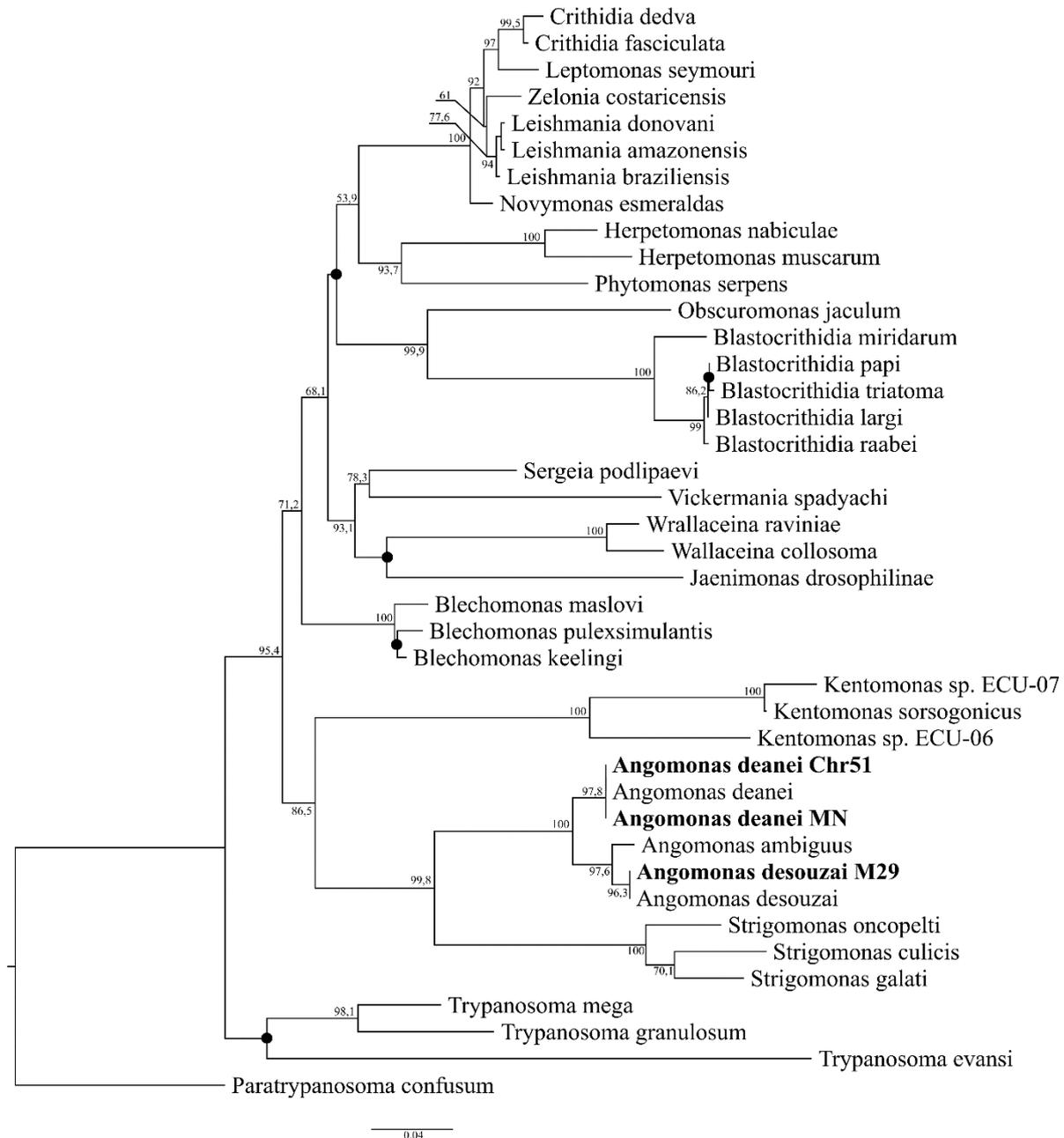


Рис. 3. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены черными кругами. Масштабная линейка обозначает количество замен на сайте. Полученные нами изоляты выделены полужирным шрифтом.

Несмотря на наличие морфологических особенностей, характерных для стригомонадин, мы не обнаружили в цитоплазме изученных штаммов р. *Wallaceina* бактериальных симбионтов. Наиболее вероятным представляется предположение, что в этой группе симбионт-содержащие виды отсутствуют, а септированная тубулема и прочие признаки (как то: редуцированный парафлагеллярный тяж и относительно рыхлый кинетоласт), появляются в этой эволюционной линии независимо. Тем не менее, мы не

исключаем сценарии, при которых симбионт-содержащие виды в этой кладе могли, либо могут существовать, или же были утрачены в ходе эволюции этой группы. Изучение данного вопроса требует дополнительных геномных исследований.

Изучение морфологии *Leptomonas repentinus* по архивным гистологическим мазкам и публикации с описанием этого вида (Малышева, Фролов, 2002) позволяет нам сделать вывод о принадлежности этого жгутиконосца к р. *Vickermania* (Kostygov et al., 2020). Этот паразит имеет комплекс характерных признаков: наличие так называемых «двужгутиковых промастигот», и крупный рыхлый кинетопласт.

На сегодняшний день в составе р. *Vickermania* описаны только 2 вида: *V. ingenoplastis* и *V. spadyakhi*, которые являются апосимбионтными. Судя по ранним ультраструктурным исследованиям, в цитоплазме *Vickermania (Leptomonas) repentinus* присутствуют симбионт-подобные тела, которые находятся в тесном контакте с митохондрионом (Малышева, Фролов, 2002). Эти факты позволяют нам предполагать, что в пределах данного рода могут существовать как апосимбионтные виды, так и виды, вступающие в симбиотические ассоциации.

Поиск симбионт-содержащих изолятов трипаносоматид в природных популяциях хозяев на севере России

Нам удалось обнаружить 3 вида симбионт-содержащих трипаносоматид на севере Евразии. Два из них принадлежат к широко распространённым симбионт-содержащим трипаносоматидам р. *Angomonas*. Третий вид – *Phytomonas borealis*, который принадлежит к группе преимущественно диксенных паразитов высших растений. Более подробное обсуждение *P. borealis* приведено в следующем разделе.

Angomonas deanei был обнаружен в двух локациях: на северо-западе Ленинградской области (изолят MN) и на западном побережье Камчатки (изолят Chr51). Впервые этот вид был выделен из кишечника редувиидного клопа *Zelus leucogrammus* (Hemiptera, Reduviidae) в Бразилии (Carvalho 1973). Впоследствии он был обнаружен в мухах сем. Calliphoridae, Muscidae, Syrphidae и Sarcophagidae преимущественно в регионах экваториального, субэкваториального, тропического или субтропического поясов: Африке (Гана, Кения), Южной Америке (Эквадор), Европе (Болгария, Чехия, Турция), Центральной Азии (Монголия), Папуа-Новой Гвинее и Мадагаскаре и Центральной Америки (Tůč et al., 2013; Borghesan et al., 2018). Наши исследования показывают, что вид, по-видимому, так же широко распространён в умеренном и, возможно субарктическом поясах Евразии.

Второй вид – *Angomonas desouzai*, был обнаружен на севере Псковской области (изолят M29) в мухе сем. Lauxaniidae. Как и *A. deanei*, ранее он отмечался исключительно в регионах экваториальной и субэкваториальной зон: в Африке, Южной и Центральной Америке. В литературе имеются данные о встречаемости *A. desouzai* в мухах сем. Sarcophagidae, Calliphoridae, Syrphidae (Тýщ et al., 2013; Borghesan et al., 2018). Сейчас можно сказать, что его ареал и круг хозяев шире, чем это представлялось ранее.

По всей видимости, широкая распространённость и отсутствие строгой гостальной специфичности *A. deanei* и *A. desouzai* лежат в основе крайне успешной стратегии, которая связана с расширением ареала за счёт активного освоения новых групп хозяев.

2. *Phytomonas borealis*: первый симбионт-содержащий представитель подсем. Phytomonadinae

- Результаты

В ходе исследования паразитарных инфекций у имаго клопов *Picromerus bidens* нам удалось обнаружить заражение этих насекомых паразитическими жгутиконосцами. В анализ были включены насекомые из двух различных популяций, собранные в Новгородской (окрестности дер. Оксочи) и Псковской (окрестности дер. Ляды) областях в период с 2016 по 2019 гг.

Таб. 3. Встречаемость двух видов трипаносоматид у клопов *Picromerus bidens* (Linnaeus).

Год	Имаго		Личинки
	<i>Phytomonas borealis</i> sp. n.	<i>P. nordicus</i> Frolov et Malysheva, 1993	
Новгородская обл.			
2016	31% (5/16)	0% (0/16)	—
2017	0% (0/23)	0% (0/23)	0% (0/21)
2018	0% (0/37)	0% (0/37)	0% (0/15)
2019	0% (0/19)	0% (0/19)	0% (0/10)
Псковская обл.			
2017	8% (2/26)	15% (4/26)	—
2018	13% (4/32)	22% (7/32)	—

За четырёхлетний период наблюдений нам удалось лишь однажды обнаружить заражённых клопов среди насекомых, собранных в Новгородской области (табл. 3). 5 из 16 (31%) вскрытых особей *P. bidens* содержали в своей средней кишке чрезвычайно длинных червеобразных промастигот, относящихся к роду *Phytomonas* (рис 4 А). Среди насекомых, собранных в Псковской области, присутствие фитомонад отмечалось два года подряд, однако отмечались два различных типа инфекции: в одном случае длинные

червеобразные трипаносоматиды, подобные вышеописанным паразитам из Новгородской области, занимали среднюю кишку (8-13%) (рис 4 В), в другом это были промастиготы с иной морфологией, клетки которых отличались спиральной закрученностью (рис 4 С). Такие клетки заселяли как кишечник насекомого, так и его гемолимфу, а также слюнные железы (15-22%). Последние в значительной степени напоминали трипаносоматид *Phytomonas nordicus*, который ранее был обнаружен в том же регионе (Frolov et al., 2016).

- Филогенетический анализ

Анализ последовательностей гена 18S рНК позволил нам идентифицировать трипаносоматид. Трипаносоматиды, характеризовавшиеся спиральной закрученностью с внекишечными стадиями, были идентифицированы как *P. nordicus* (100% идентичность, 1781 нукл.).

Последовательность второго вида фитомонад была уникальной. Ближайшим попаданием BLAST среди последовательностей базы данных GenBank был *P. nordicus* с различиями в 8 положениях нуклеотидов между двумя последовательностями (на 1781 нукл.), что указывает на принадлежность двух трипаносоматид к разным видам (d'Avila-Levy et al. 2015). Анализ максимального правдоподобия и байесовский филогенетический анализ, основанные на гене 18S рНК, подтвердили тесную связь этих двух видов с высокой достоверностью (рис. 5). Ниже мы будем концентрироваться только на описании нового вида.

- Морфология

- 1) Световая и флуоресцентная микроскопия.

У всех особей *P. bidens*, заражённых *P. borealis*, мы наблюдали инфекцию в средней кишке. Промастиготы образуют морфологически однородную популяцию по всей длине средней кишки, но наиболее многочисленны в сегменте М2. Тело промастигот длинное, червеобразное, лишено спиральной закрученности; размеры клеток в среднем составляли 35x1,3 мкм (таб. 4). Длина жгутика была примерно равна длине клетки. Различия между морфологическими параметрами паразитов из разных популяций хозяина были незначительными. Овальное ядро было продольно ориентировано относительно клетки паразита, его длина почти в 3 раза превышала ширину. Кинетопласт располагался субтерминально в передней части клетки.

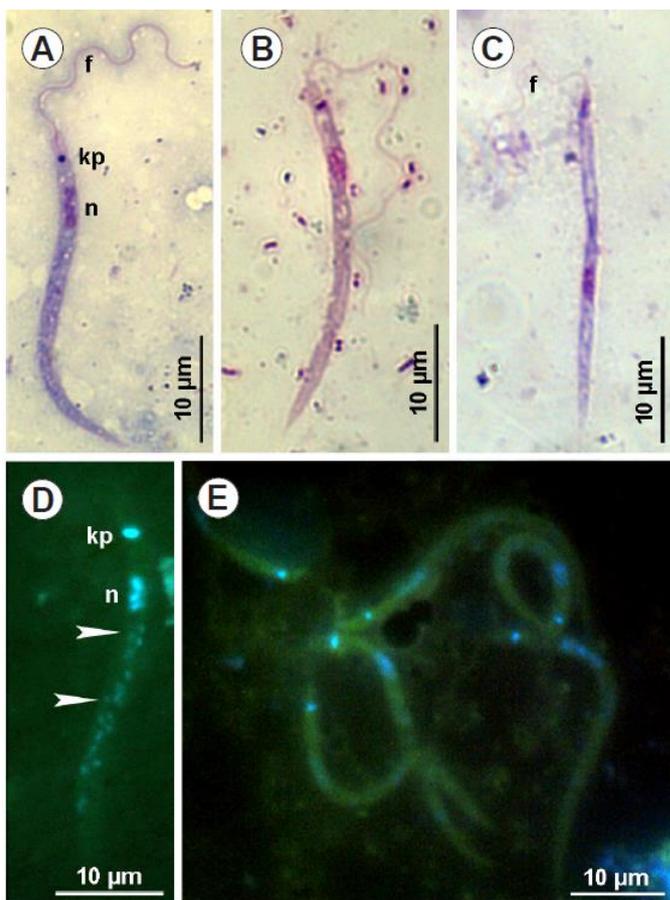


Рис. 4. Промастиготы *Phytomonas* spp. из клопа *Picromerus bidens* (световая и флуоресцентная микроскопия). А, D – *P. borealis* sp. n. из Новгородской области; В, Е – *P. borealis* из Псковской области; С – *P. nordicus* Frolov et Malysheva, 1993 из Псковской области; А-С – окрашивание по Гимзе-Романовскому; D, Е – окрашивание DAPI.

f – жгутик; кр – кинетоласт; n – ядро; стрелками показаны прокариотические симбионты.

Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI выявило множество небольших (около 20) ДНК-содержащих бактериоподобных телец, расположенных преимущественно в постнуклеарной части клетки (рис. 4 D). Эти тела были обнаружены только у трипаносоматид из Новгородской области, в то время как у жгутиконосцев из второй локации эти структуры не наблюдались. Как правило такие бактериоподобные тела имели шаровидную, либо реже палочковидную форму.

2) Электронная микроскопия

Промастиготы *P. borealis* не образуют видимых контактов с клетками кишечного эпителия хозяина (рис. 6 А). Ультраструктура жгутиконосцев в целом типична для представителей р. *Phytomonas*: выраженная тубулемма с правильным корсетом микротрубочек, коротким, терминально расположенным жгутиковым карманом, ядром с пристеночным слоем хроматина и центральным ядрышком, а также компактный кинетоласт со стержневидным (рис. 6 В, С). Комплекс Гольджи располагается рядом с кинетоластом (рис. 6 В). Цитоплазма содержит многочисленные рибосомы, гликосомы, ацидокальцисомы и митохондриальные ветви (рис. 6 С).

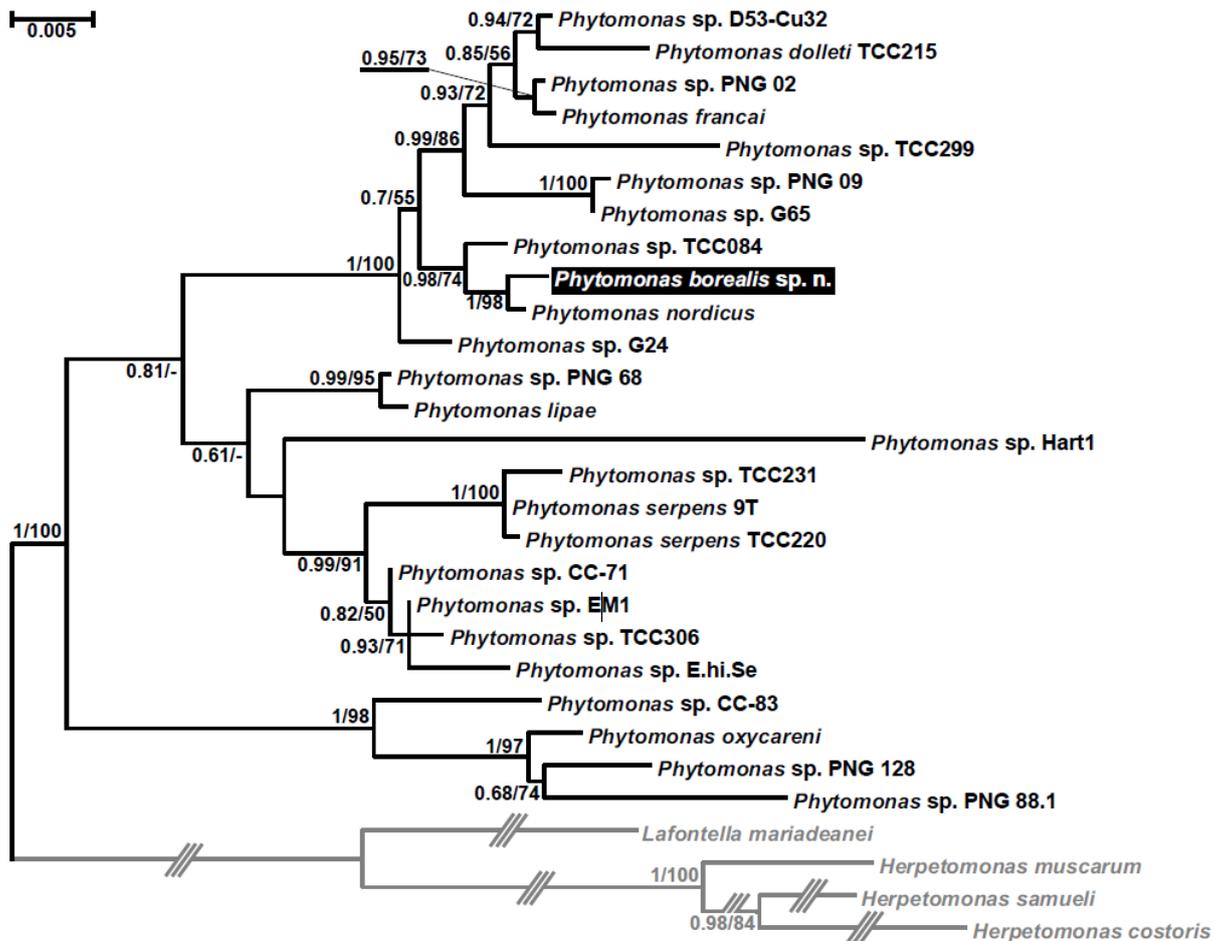


Рис. 5. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены черными кругами. Ветви с тройным перечёркиванием сокращены на 1/3 от их первоначальной длины. Масштабная линейка показывает количество замен на сайте. Исследуемый вид *Phytomonas borealis* sp. n., выделен.

Примечательной особенностью промастигот *P. borealis* стало присутствие бактериоподобных структур в цитоплазме (рис. 6 С – G). Эти структуры окружены двойным слоем мембран. Внешняя из двух мембран, окружающих их, по-видимому, является мембраной хозяина-жгутиконосца, судя по ее контактам с эндоплазматическим ретикуломом (Рис. 6 F, G). В бактериальных клетках не обнаружено ни периплазматического пространства, ни клеточной стенки (рис. 6 D, G).

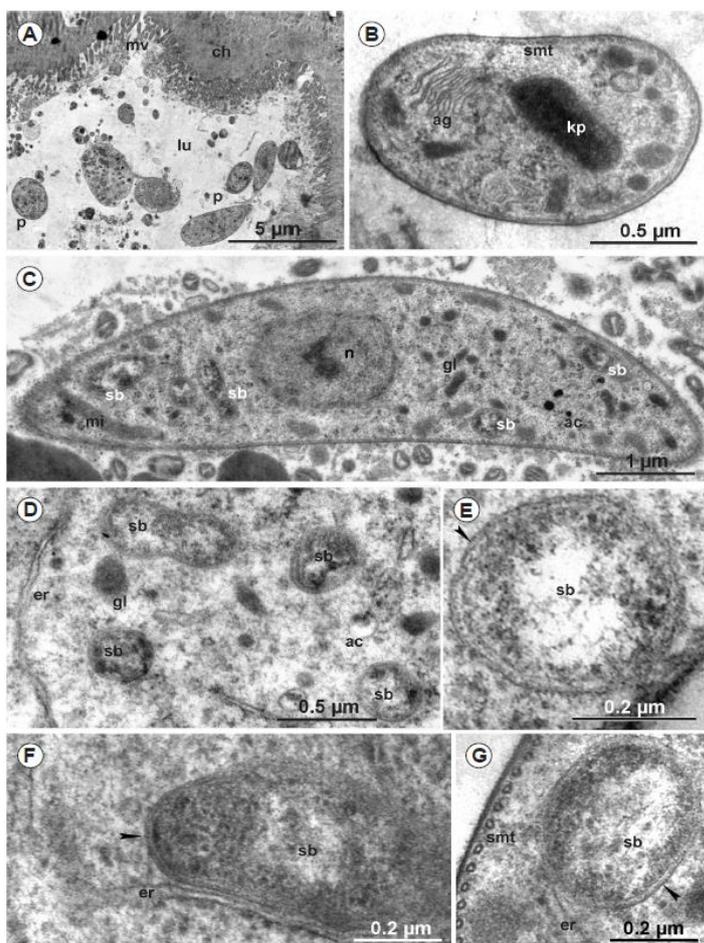


Рис. 6. Промастиготы *Phytomonas borealis* sp. n. из *Picromerus bidens* (Linnaeus) (ТЕМ). А – жгутиконосцы в просвете средней кишки; В – поперечный срез через клетку; С – продольный срез через клетку; D-G – прокариотические эндосимбионты в цитоплазме жгутиконосцев. ac – ацидокальцисомы; ag – комплекс Гольджи; ch – эпителиальная клетка хозяина; er – эндоплазматическая сеть; gl – гликосомы; kp – кинетопласт; lu – просвет кишечника; mi – митохондрия; mv – микроворсинки; n – ядро; p – промастиготы; sb – прокариотический симбионт; smt – субпелликулярные микротрубочки; стрелками показана мембрана симбионтофорной вакуоли.

Таб. 4. Морфометрия промастигот *Phytomonas borealis* (N = 31).

Я-П – расстояние между ядром и передним концом клетки; Я-К – расстояние между ядром и кинетопластом; К-П – расстояние между кинетопластом и передним концом клетки. Все размеры указаны в мкм.

Изолят	Длина	Ширина	Ядро	Я-П	Я-К	К-П	Длина жгутика
Рис3	34.8 ± 7.7	1.3 ± 0.1	3.8 ± 1.0	7.3 ± 1.9	4.8 ± 2.0	1.9 ± 0.6	33.5 ± 6.8
Новгородская область	22.1–50.1	1.1–1.7	2.1–6.3	3.7–13.5	1.6–9.2	0.9–3.0	20.5–50.9
Рис38	35.4 ± 7.5	1.3 ± 0.1	3.8 ± 0.6	7.2 ± 2.0	4.9 ± 1.5	1.9 ± 0.5	35.0 ± 8.6
Псковская область	20.6–48.5	1.1–1.5	2.5–5.3	3.1–11.7	2.9–10.5	1.1–2.8	20.4–54.1

- Обсуждение

Клоп *Picromerus bidens* принадлежит к подсемейству Asorinae, включающему хищных представителей семейства Pentatomidae (Schuh and Slater 1995). Этот вид широко распространен в Палеарктике, а также был завезен в Северную Америку, где успешно акклиматизировался. *P. bidens* – многоядный хищник, добыча которого насчитывает более 250 видов различных отрядов насекомых (Panizzi et al., 2000). Данный щитник является

универсальным видом (формирует только 1 выводок за сезон), зимовка преимущественно протекает на стадии яйца (эмбриональная зимняя диапауза), хотя так же были зарегистрированы случаи гибернации имаго (Saulich and Musolin, 2014). Предположительно эти редкие случаи связаны с паразитарной инвазией личинками тахинид, и, вероятно, такие заражённые имаго не могут размножиться в течение последующего сезона.

Вышеперечисленные факты, наряду с нашими наблюдениями, не показавшими наличия заражённых личинок этого вида в исследованных популяциях клопов, косвенно указывают на неспецифический характер данной системы «паразит-хозяин». Ещё одним важным аргументом в пользу этого предположения является отсутствие внекишечных стадий развития среди наблюдаемых инфекций, вызванных *Phytomonas borealis*. Даже *P. nordicus*, перешедший к вторичной моноксении, сохраняет классическую программу развития фитомонад в насекомом-хозяине и выходит в гемолимфу с дальнейшим проникновением в слюнные железы. На сегодняшний день для всех описанных видов фитомонад были описаны стадии эндомастигот – покоящиеся стадии, обеспечивающие трансмиссию между хозяевами (Jankevicius et al. 1989, Freymuller et al. 1990, Frolov et al., 2016, 2019, Zanetti et al. 2016, Seward et al. 2017). Однако нам не удалось обнаружить этих стадий у клопов, инфицированных *P. borealis*.

В то же время *P. nordicus*, основным хозяином которого является хищный клоп *Troilus luridus*, проходит нормальное развитие и в щитниках *P. bidens*. Таким образом можно предположить, что заражение последнего фитомонадой *P. nordicus* так же является неспецифичным заражением. В целом способность хищных клопов являться своего рода «агрегатором» трипаносоматид, которых они получают при питании заражённой жертвой, неоднократно обсуждалась в литературе (Wallace 1966, Podlipaev 2001, Kozminsky et al. 2015). Учитывая чрезвычайно широкий круг потенциальных жертв *P. bidens*, определить конкретного хозяина паразита *P. borealis*, обсуждаемого в данном разделе, в настоящее время невозможно.

Близкое филогенетическое положение фитомонад *P. borealis* с *P. nordicus* позволяет предполагать, что новый вид так же может являться моноксенным. И в этом случае хищный характер щитника *P. bidens* не может служить базисом для построения предположений о характере жизненного цикла жгутиконосца, поскольку инфекция, по-видимому, не является специфичной. Вероятно, специфичным хозяином *P. borealis* могут являться насекомые, обитающие в иных биотопах. Их случайное распространение за пределы привычных биотопов в теории могло бы быть правдоподобным объяснением низкой частоты и спорадического характера инфекций *P. bidens*. Однако, даже если

жизненный цикл *P. borealis* является диксенным, его подробное изучение должно быть интересно из-за эволюционной близости этого паразита к *P. nordicus* и могло бы пролить больше света на феномен вторичной моноксении.

Большинство известных видов и штаммов фитомонасов были изолированы в Южной Америке (Jaskowska et al. 2015), что в значительной степени повлияло на сложившееся представление о географическом распространении рода. Между тем, *P. borealis* – уже третий вид, обнаруженный в бореальной зоне Евразии к северу от 55° с.ш. (Frolov et al., 2016, 2019). На сегодняшний день связь с растениями не подтверждена ни для одного из этих видов. В то время как для *P. nordicus* была продемонстрирована трансмиссия только между насекомыми-хозяевами (Фролов и Малышева 1993, Frolov et al., 2016), природа жизненных циклов *Phytomonas lipae* и *P. borealis* остается неясной и требует дальнейшего изучения.

Совершенно неожиданным фактом стало обнаружение эндосимбионтов в цитоплазме промастигот *P. borealis*, поскольку ни один из ранее описанных представителей рода *Phytomonas* не содержит симбиотических бактерий. Множественность эндосимбионтов у *P. borealis* напоминает ситуацию у *N. esmeraldas*, где симбиотические отношения до конца не установлены. Более того, отсутствие бактерий в цитоплазме жгутиконосцев Псковской области указывает на возможность того, что эта эндосимбиотическая система находится в «младенческом» состоянии и, следовательно, не является облигатной. Неясно, теряла ли свободная от бактерий популяция *P. borealis* эндосимбионтов или никогда их не было. Чтобы ответить на этот вопрос, а также определить таксономическое положение симбионтов и понять их взаимодействие с трипаносоматидным хозяином, необходимо получить аксеническую лабораторную культуру *P. borealis*. Тем не менее, нет сомнений в том, что эта эндосимбиотическая система возникла независимо от ранее изученных, и ее исследование должно пролить свет на происхождение и раннюю эволюцию эндосимбиозов у трипаносоматид.

3. *Angomonas deanei*: морфология и жизненный цикл

- **Результаты**

Трипаносоматиды, идентифицированные как *Angomonas deanei* при помощи молекулярного штихкодирования, были обнаружены нами в 2016 г. в кишечнике мухи *Lucilia sp.* в Ленинградской области в окрестностях пос. Комарово (60°11' с. ш., 30°48' в. д.). Жгутиконосцы образовывали массовое скопление в ректуме насекомого-хозяина. Была получена аксеническая культура трипаносоматид *A. deanei* MN, которая в настоящее время депонирована в коллекцию клеточных культур ЗИН РАН (Malysheva et al., 2016).

Анализ последовательностей показал идентичность с другими изолятами данного вида (рис. 3).

Мы провели ряд исследований, касающихся структуры культуральных форм *A. deanei* MN, а также поставили серию экспериментов по моделированию жизненного цикла, способов передачи, и оценке гостальной специфичности этого паразита.

Морфология *Angomonas deanei* в культуре

Световая микроскопия

Мы выделили три основных морфотипа среди клеток культуры *A. deanei* MN. Первый морфотип – промастиготы – характеризуются удлинённой формой, смещённым к переднему концу клетки кинетопластом и овальным ядром, которое занимает срединное положение. Промастиготы имеют относительно крупные размеры среди остальных морфотипов (рис. 7 А) (таб. 5). Жгутик хорошо выражен, его длина в среднем составляет 6 мкм. Второй морфотип – парамастиготы, у которых ядро так же располагается в центре клетки, а кинетопласт занимает варьирующее положение от переднего края ядра до заднего (рис. 7 С). Парамастиготы имеют меньшие размеры, длина свободной части жгутика не превышает 5 мкм. Третий морфотип – опистомастиготы (рис. 7 В). Для клеток этого типа характерно смещение ядра к заднему концу клетки, кинетопласт располагается за ним, занимая дистальное положение. Клетки обладают глубоким жгутиковым карманом, сам жгутик не выходит за его пределы, либо его свободная часть сильно укорочена.

Таб. 5. Морфометрия *Angomonas deanei* в культуре (N = 31).

Я-П – расстояние между ядром и передним концом клетки; Я-К – расстояние между ядром и кинетопластом; К-П – расстояние между кинетопластом и передним концом клетки. Все размеры указаны в мкм.

Морфотип	Длина	Ширина	Ядро	Я-П	К-П	Длина жгутика
Промастиготы	6,42 ±1,38 (5,52-8,85)	1,76 ±0,39 (1,41-2,43)	1,71 ±0,34 (1,11-2,34)	2,58 ±0,50 (1,36-3,07)	1,92±0,66 (1,13-2,97)	4,56 ±1,44 (3,32-6,17)
Опистомастиготы	4,12 ±1,25 (3,34-6,81)	1,56 ±0,28 (1,04-2,21)	1,69 ±0,28 (1,35-2,24)	2,61 ±0,59 (1,59-3,82)	2,89±0,76 (1,68-3,82)	2,26 ±0,52 (1,67-4,92)
Парамастиготы	5,61 ±1,35 (3,39-8,62)	1,71 ±0,43 (1,22-2,49)	1,75 ±0,37 (1,19-2,22)	2,19 ±0,67 (1,13-2,98)	2,04±0,66 (1,13-2,97)	4,04 ±1,23 (2,09-5,18)

Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI показало наличие в клетках *A. deanei* MN цитоплазматических симбионтов. Симбионт-содержащие клетки встречаются среди всех описанных выше морфотипов. Сами бактериальные симбионты располагаются как правило за задним краем ядра. Мы выделили три типа симбионтов в клетках жгутиконосца: одиночные округлые формы (рис. 8 А), симбионты гантелеобразной формы (рис. 8 В), и парные симбионты (рис. 8 С). Вероятнее всего, разнообразие морфотипов эндосимбионтов в данном случае отражает последовательные фазы их клеточного цикла.

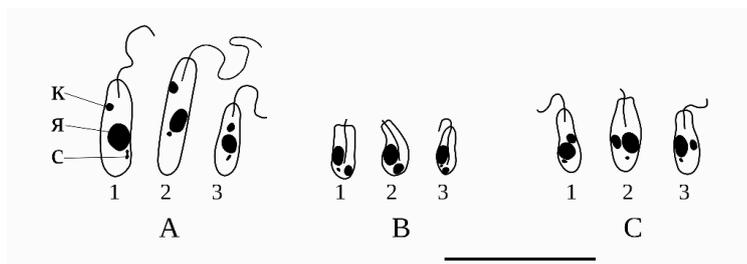


Рис. 7. Разнообразие морфотипов *Angomonas deanei* (MN) в культуре (схема). А – промастиготы; Б – опистомастиготы; В – парамастиготы. к – кинетопласт; с – эндосимбионт; я – ядро. Масштабная линейка: А-В – 10 мкм.

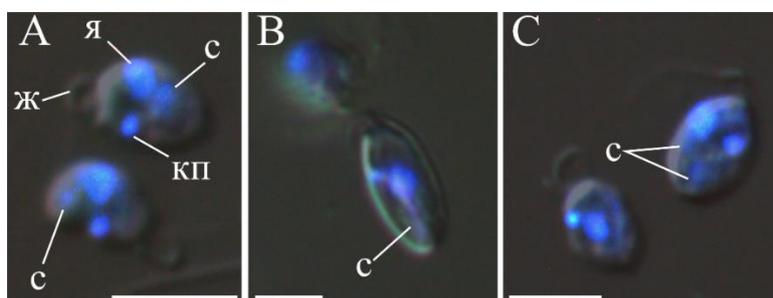


Рис. 8. Совмещенное фото DIC- и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI) клеток *Angomonas deanei* (MN) в культуре. А – клетка с одним симбионтом в цитоплазме; В – клетка делящимся гантелеобразным симбионтом; Г – клетка с двумя симбионтами. Масштабная линейка – 10 мкм.

Ультраструктура *Angomonas deanei* в культуре

Ультратонкая организация клеток *A. deanei* MN является типичной для большинства изученных стигомнад. Клетки округлой формы, с глубоким жгутиковым карманом, который может почти достигать заднего края клетки (рис. 9 А). Снаружи жгутиконосцы покрыты плазмалеммой, которая выстилает их жгутиковый карман и переходит на жгутик. На выходе из жгутикового кармана заметны десмосомо-подобные контакты между мембранами жгутика и жгутикового кармана.

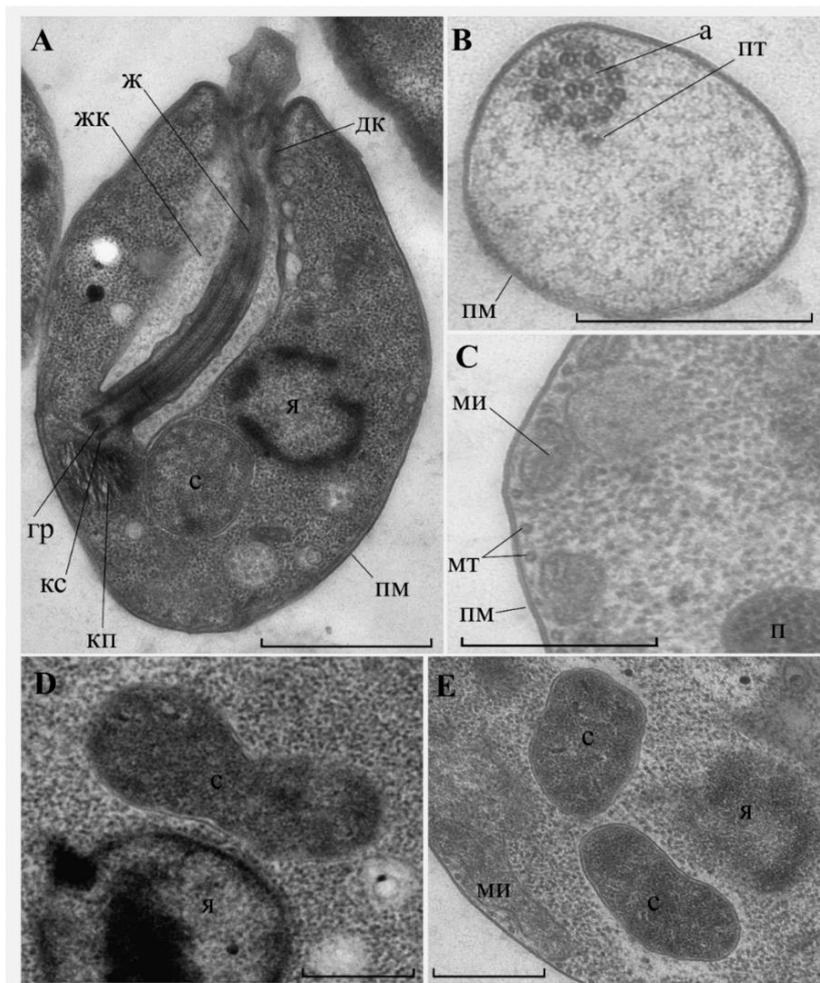


Рис. 9. Ультраструктура *Angomonas deanei* (MN) в культуре. А – продольный срез; В – поперечный срез через основание жгутика; С – участок поперечного среза; D, E – срез на уровне ядра
а – аксонома жгутика; гр – электронно-плотная гранула; дк – десмосоподобные контакты; ж – жгутик; жк – жгутиковый карман; кс – кинетосома; кп – кинетопласт; ми – ветви митохондрия; мт – субмембранные микротрубочки; п – пероксисома; пм – плазматическая мембрана; пт – рудиментарный парафлагеллярный тяж; с – эндосимбиотическая бактерия; я – ядро. Масштабные линейки, мкм: А – 1 μ , D, C, D, E – 0,5 μ .

Непосредственно за пределами жгутикового кармана ундулоподия слегка расширяется. Короткая кинетосома жгутика располагается у передней поверхности кинетопласта. Ее отличительной особенностью является наличие электронно-плотной гранулы, занимающей большую часть внутреннего пространства кинетосомы (рис. 9 А). Переходная зона жгутика достигает 291 нм, терминальная пластинка переходной зоны расположена на расстоянии около 220 нм от дна жгутикового кармана. Аксиальная гранула не выражена. В первой трети свободной части ундулоподии обнаруживаются элементы редуцированного параксиального тяжа (рис. 9 В). Непосредственно под плазмалеммой располагаются продольно ориентированные субмембранные микротрубочки. Микротрубочки расположены нерегулярно, в брешах между ними обнаруживаются профили митохондрия (рис. 9 С, Е). В отдельных ветвях митохондрия заметны немногочисленные пластинчатые кристы. В цитоплазме обнаруживаются бактериальные симбионты, заключенные в цитобионтофорные вакуоли (рис. 9 А, D, Е). На электронограммах отмечены профили симбионтов: единичные, неделимые бактерии (рис. 9 А), бактерии, находящиеся в процессе деления (рис. 9 D), и полностью разделившиеся особи (рис. 9 Е).

Жизненный цикл *Angomonas deanei* MN в кишечнике личинок и имаго *Lucilia sericata* и *Calliphora vicina*

Развитие *A. deanei* в личинках *L. sericata* и *C. vicina*

Строение пищеварительной системы личинок каллифорид представлено на рис. 10 А. Передняя кишка включает глотку, оэзофагус, от которого отходит канал, ведущий в крупный слепозамкнутый пищевой резервуар (не указаны на 10 А), и расширенным провентрикулюсом, на котором расположены небольшие пилорические выросты. Средняя кишка достаточно длинная, её характерной особенностью является наличие перитрофической мембраны, ограничивающей пищевой комок непосредственно от стенки кишки. Граница между средней и задней кишкой маркируется за счёт небольшого сужения – пилорического клапана. Задняя кишка личинок мух слабо дифференцировала внешне, её принято разделять на антериальную заднюю кишку, куда впадают Мальпигиевы сосуды, и постериальную заднюю кишку, которая завершается анальным отверстием.

Эксперимент 1. Динамика инфекции при краткосрочном однократном заражении

Целью первой группы экспериментов было изучение динамики продвижения *A. deanei* по пищеварительному тракту личинок непосредственно после заражения. Однодневных личинок и в течение 10 минут содержали на субстрате, заражённом культурой *A. deanei* MN (см. материалы и методы), после чего пересаживали на обычный питательный субстрат (говяжью печень) и вскрывали через определённые промежутки времени. В течении 5-30 минут после заражения было вскрыто 20 личинок *L. sericata* и 9 личинок *C. vicina* (таб. 6). У всех особей в просвете передней кишки и передних отделах средней кишки присутствовали свободно плавающие клетки *A. deanei*.

В течение двух последующих часов жгутиконосцы вместе с пищевым комком распространялись по всей кишке хозяина, достигая её задних отделов. Далее, в период с 4 до 24 часов после питания на заражённом субстрате, в просвете средней и задней кишки вскрытых личинок были отмечены немногочисленные клетки жгутиконосцев. Примечательно, что каких-либо агрегаций трипаносоматиды не формировали.

В течение следующих двух суток мы обнаруживали отдельные клетки трипаносоматид в среднем и заднем кишечнике личинок, но ни разу не отмечали массовых скоплений жгутиконосцев. В кишечнике насекомых, вскрытых на 3 и 5 сутки с момента заражения, мы не обнаружили даже единичных клеток трипаносоматид.

Таб. 6. Кратковременное однократное заражение однодневных личинок *Lucilia sericata* и *Calliphora vicina*.

Время с момента заражения	<i>Lucilia sericata</i>	<i>Calliphora vicina</i>	Сайт инфекции
5-30 мин	100% (20/зар 20)	100% (9/зар 9)	Передняя кишка/пищевой резервуар
30 мин – 2 ч 30 мин	100% (25/зар 25)	100% (11/зар 11)	Передняя кишка/пищевой резервуар, средняя кишка, задняя кишка
4 – 24 ч	100% (23/зар 23)	100% (10/зар 10)	Средняя кишка, задняя кишка (несколько клеток)
1-2 суток	% (18/зар 7)	40% (10/зар 4)	Средняя кишка, задняя кишка (несколько клеток)
3 суток	0% (13/зар 0)	0% (7/зар 0)	—
5 суток	0% (11/зар 0)	0% (10/зар 0)	—

Эксперимент 2. Динамика инфекции при непрерывном содержании на заражённом субстрате

Целью следующего эксперимента было выявление способности паразитов закрепиться в пищеварительном тракте личинок при долгосрочной инвазии. Для этого мы содержали личинок заражённом субстрате, начиная с 1го дня с момента вылупления до момента пупаризации (см. материалы и методы).

Таб. 7. Длительное заражение однодневных личинок *Lucilia sericata* и *Calliphora vicina*.

Возраст личинок	<i>Lucilia sericata</i>	<i>Calliphora vicina</i>
3 суток	100% (N=19/зар 19)	100% (N=10/зар 10)
5 суток	100% (N=21/зар 21)	90% (N=10/зар 9)
6-7 суток (фаза окончания питания)	11% (N=18/зар 2)	1% (N=10/зар 1)
8 суток (фаза препупария)	0% (N=20/зар 0)	0% (N=10/зар 0)
Имаго	0% (N=8/зар 0)	0% (N=9/зар 0)

Часть личинок вскрывали для оценки уровня заражённости в течение личиночного периода развития. На 3-5 сутки отмечен довольно высокий процент заражённых особей: отдельные клетки встречались в просвете всех отделов кишечного

тракта, не образуя скоплений (таб. 7). На 6-7 сутки личинки (перед подготовкой к пупаризации) заканчивали питание и покидали питательный субстрат, зарываясь в опилках. На этом этапе мы отмечали присутствие единичных клеток в кишечнике отдельных особей. На 8 сутки личинки становились малоподвижными, их кутикула темнела (стадия препупария), и нам не удалось обнаружить заражения ни в одном вскрытых экземпляров. Примечательно, что клетки *A. deanei* в массе присутствовали в субстрате, на котором содержались личинки, до самого конца эксперимента.

Эксперимент 3. Влияние инфекции на жизнеспособность и развитие

В числе прочих экспериментов мы провели оценку влияния инфекции на жизнеспособность личинок. Мы наблюдали за 35 личинками *L. sericata*, содержащимися на заражённом субстрате (инфицированная группа), и за 35 личинками, содержащимися на неконтоминированной говяжьей печени (контрольная группа). На 8 сутки произошла пупаризация насекомых. Мы отмечали 35 пупариев в случае инфицированных личинок и 31 пупарий в случае контрольной группы (таб. 8).

Таблица 8. Влияние инфекции на жизнеспособность и развитие личинок *L. sericata* при длительном заражении *Angomonas deanei*.

Личинки <i>Lucilia sericata</i>	Инфицированная группа (N=35)	Контрольная группа (N=35)
Пупаризация	30	31
Вылупившиеся имаго (12-14 суток)	29	28
Заражённые имаго	0	0

Спустя 12-14 суток с момента пупаризации произошёл вылет имаго: 29 и 28 особей *L. sericata* в 1 и 2 группах соответственно. В ходе вскрытия вылетевших мух мы не выявили наличия инфекции ни в одном из взрослых насекомых (таб. 8).

- Инфекция *A. deanei* MN в имаго *L. sericata* и *C. vicina*

Пищеварительная система имаго *L. sericata* и *C. vicina* имеет типичную для большинства брахицер организацию (рис. 10 В, С). Передняя кишка представлена глоткой (не указана на рис. 10), коротким озофагусом, от задней части которого отходит длинный канал, ведущий в крупный слепозамкнутый пищевой резервуар. Провентрикулус значительно расширен. Длинная средняя кишка морфологически не разделена на отделы. Её характерной особенностью является наличие перитрофической мембраны, в которую «упакован» пищевой комок. Границу между средней и задней кишкой маркирует пилорический клапан. Задняя кишка дифференцирована на три отдела. Пилорический отдел, расположенный между пилорическим клапаном и пилорическим сфинктером,

является местом впадения мальпигиевых сосудов. За ним следует продолговатый илеум, заканчивающийся ректальным клапаном. Крупный расширенный ректум, так же называемый ректальной ампулой, имеет 4 выраженных ректальных железы. Из ректума выходит прямая кишка, завершающаяся анальным отверстием.

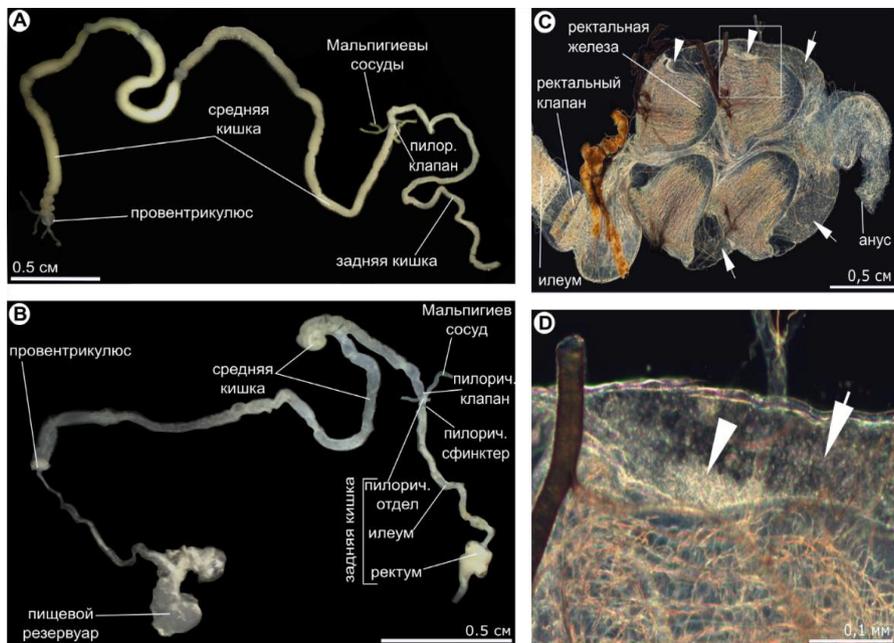


Рис. 10. А – пищеварительный тракт личинки *Lucilia sericata*. В – пищеварительный тракт имаго *L. sericata*. С-D – ректум инфицированного имаго *L. sericata*.

Стрелка указывает на скопления прикрепленных трипаносоматид; стрелка с наконечником указывает на скопления свободно плавающих трипаносоматид.

Эксперимент 1: динамика инфекции в *A. deanei* в кишечнике имаго *L. sericata* и *C. vicina*

Первая группа экспериментов была направлена на изучение динамики распространения инфекции в кишечнике насекомых. Для этого взрослых мух трёхдневного возраста содержали без воды в течение 24 часов, после чего им предлагалась капля культуральной среды объемом 5 мкл, содержащая *A. deanei* (см. материалы и методы). Затем мух вскрывали через определённые временные промежутки (таб. 9).

Вскрытие имаго показало, что спустя 5 минут с момента заражения клетки паразитов распространялись вслед за жидкостью по всем отделам передней кишки, включая пищевой резервуар и провентрикулус, а также передним отделам средней кишки. Однако уже через 1 час жгутиконосцы оккупировали весь пищеварительный тракт, достигая отделы задней кишки – илеумы и ректумы.

Через 4 часа после начала эксперимента трипаносоматиды окончательно покидали переднюю кишку (в том числе – слепозамкнутый пищевой резервуар) и переднюю часть средней кишки. Через 24 часа с момента заражения и в течение последующих 3 суток жгутиконосцы были отмечены исключительно в ректуме у всех

вскрытых насекомых (рис. 10 С, D). Судя по всему, закрепляясь в ректуме, клетки *A.deanei* в дальнейшем не выходят за его пределы, активно размножаясь в этом отделе.

Таб. 9. Динамика инфицирования пищеварительного тракта имаго *Lucilia sericata* и *Calliphora vicina*.

Время с момента заражения	<i>Lucilia sericata</i>	<i>Calliphora vicina</i>	Сайт инфекции
5 мин	100% (N=25/зар 25)	100% (N=10/зар 10)	Передняя кишка/пищевой резервуар, средняя кишка
30 мин – 1 ч	100% (N=18/зар 18)	100% (N=12/зар 12)	Передняя кишка/пищевой резервуар, средняя кишка, задняя кишка
4 – 24 ч	100% (N=21/зар 20)	100% (N=15/зар 15)	Средняя кишка, задняя кишка
1-2 сутки	100% (N=24/зар 24)	100% (N=12/зар 12)	Задняя кишка (ректум)

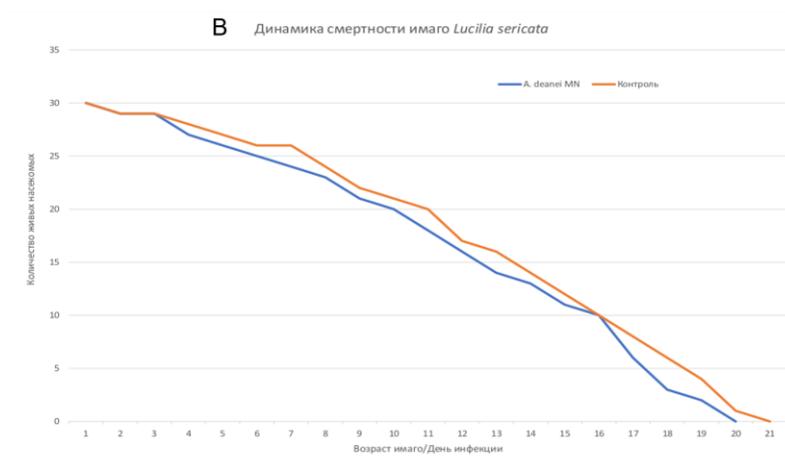
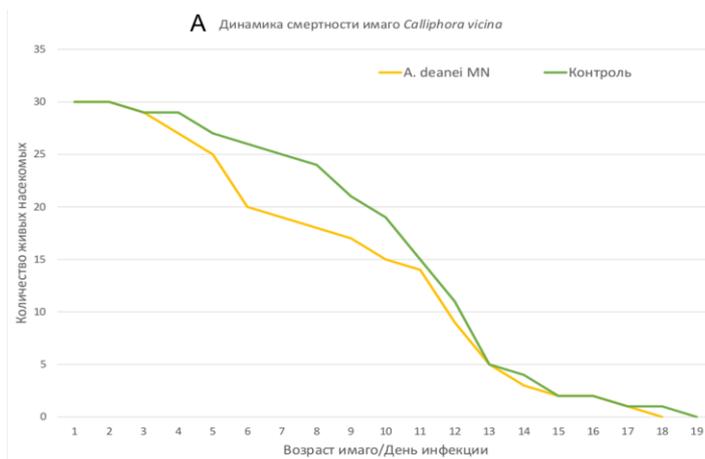
Эксперимент 2: Продолжительность персистирования *A. deanei* в кишечнике имаго *L. sericata* и *C. vicina* после однократного заражения

Заражённых мух помещали в пластиковые трубки диаметром 5 мм (см. материалы и методы). Подобная конструкция «домиков» позволяла изолировать заражённых мух от сородичей, а также исключала возможности движения самой мухи. Таким образом мы полностью предотвращали возможность заражения насекомых через субстрат, контаминированный их собственными экскрементами.

Динамика смертности мух, как заражённой, так и контрольной группы, отражается линейными графиками. Максимальный срок жизни заражённых *L. sericata* в условиях иммобилизации составил 21 день, так же, как и в контрольной группе (рис. 11 А). Примечательно, что максимальный срок жизни мух в садках в аналогичных условиях температуры и светового режима составил 37 суток (N=30).

Максимальный срок жизни *C. vicina* (рис. 11 В) в условиях иммобилизации составил 17 суток. Максимальный срок жизни контрольной группы в тех же условиях составлял 18 суток. Максимальная продолжительность жизни мух этого вида в садках в аналогичных условиях температуры и светового режима составила 26 дней (N=30).

Рис. 11. Динамика смертности имаго в условиях иммобилизации.



Эксперимент 3: внутривидовая горизонтальная трансмиссия *A. deanei*

В ходе следующего эксперимента нам удалось продемонстрировать возможность внутривидовой горизонтальной трансмиссии паразитов между имаго. Одну инфицированную муху помечали, подрезая крыло, и помещали в контейнер с пятью незаражёнными имаго трёхдневного возраста. После 5 суток совместного содержания исходно незараженных насекомых вскрывали. Мы провели 7 повторных экспериментов для имаго *L. sericata*, в результате 13 мух из 35 изначально незаражённой группы (37,1%) оказались заражены. В аналогичной схеме при 4 повторных экспериментах для *C. vicina* нам удалось зафиксировать 11 случаев успешных заражений из 17 (64,7%).

Эксперимент 4: межвидовая горизонтальная трансмиссия *A. deanei*

Мы провели 4 серии экспериментов по горизонтальной передаче инфекции между разными видами мух. Заражённый вид-донор подсаживали к незараженным мухам другого вида в соотношении 3 инфицированных к 5 стерильным. Всех насекомых вскрывали спустя 5 суток.

Мы проводили две линии перекрёстных межвидовых экспериментов: *C. vicina* X *L. sericata* и *L. sericata* X *P. terraenovae*. Результаты показали, что перекрёстное заражение было успешным во всех случаях (таб. 10, 11). Процент *L. sericata*, заразившихся в ходе

эксперимента от *C. vicina*, составила 63,3%. Обратная передача паразита от инфицированных *L. sericata* к *C. vicina* была отмечена в 70% случаев. Во второй линии эксперимента 60% *L. sericata* получили инфекцию от *P. terraenovae*, а в свою очередь 46,7% *P. terraenovae* заразились от *L. sericata*.

Таб. 10. Кросс-инфекции между *Calliphora vicina* и *Lucilia sericata*.

Вид-донор	Вид-акцептор	
	<i>C. vicina</i>	<i>L. sericata</i>
<i>C. vicina</i>		N=30/Зар 19 (63,3%)
<i>L. sericata</i>	N=30/Зар 21 (70%)	

Таб. 11. Кросс-инфекции между *Lucilia sericata* и *Protophormia terraenovae*.

Вид-донор	Вид-акцептор	
	<i>L. sericata</i>	<i>P. terraenovae</i>
<i>L. sericata</i>		N=15/Зар 7 (46,7%)
<i>P. terraenovae</i>	N=15/Зар 9 (60%)	

- Морфология *A. deanei* в кишечнике имаго *L. sericata*

В случае установившейся инфекции (после 24 часов с момента инвазии) мы наблюдали клетки *A. deanei* исключительно в ректуме взрослых *L. sericata* (рис. 10, С, D; рис. 12 А, Е, F). Трипаносоматиды распределены неравномерно: наибольшие скопления прикрепленных клеток располагаются на поверхности ректальных желёз. Свободные жгутиконосцы в массе плавают в просвете ректума и прямой кишки.

В ректуме хозяина клетки *A. deanei* прикрепляются жгутиками к поверхности кутикулярной выстилки (рис. 12, А-F, Н-L). Структура кутикулы ректума в местах прикрепления (рис. 12 Н-L) не изменена в сравнении с участками, свободными от паразитов (рис. 12 G). Прикрепление паразитов к поверхности ректума осуществляется кончиком жгутика или его латеральной поверхностью, и сопровождается формированием полудесмосом (рис. 12 В, D, F).

В кишечнике хозяина клетки имеют небольшие размеры (таб. 12). Основываясь на положении кинетопласта в клетке, мы выделили три морфотипа, которые встречаются в кишечнике хозяина: промастиготы, парамастиготы и опистомастиготы (рис. 13), которые соответствуют формам, описанным из культуры. Наибольший процент – 80,8 %, составляют округлые парамастиготы (рис. 13 В). Доля удлинённых промастигот составляла 10,8 % (рис. 13 А). Наиболее редкий тип – опистомастиготы, встречались с

частотой 8,4 % (рис. 13 С). Жгутиковые карманы клеток всех морфотипов широкие, хорошо выражены.

Таб. 12. Морфометрия *Angomonas deanei* в хозяине (N = 31).

Я-П – расстояние между ядром и передним концом клетки; Я-К – расстояние между ядром и кинетопластом; К-П – расстояние между кинетопластом и передним концом клетки. Все размеры указаны в мкм.

Морфотип	Длина	Ширина	Ядро	Я-П	К-П	Длина жгутика
Промастиготы	5.12 ±1.27 (3.42-7.51)	2.78 ±0.39 (1.89-3.72)	1.27 ±0.20 (0.87-1.64)	2.55 ±0.44 (1.71-3.88)	1.40 ±0.39 (0.71-2.37)	4.01 ±1.49 (1.25-7.36)
Опистомастиготы	5.12 ±1.27 (3.42-7.51)	2.78 ±0.39 (1.89-3.72)	1.27 ±0.20 (0.87-1.64)	2.55 ±0.44 (1.71-3.88)	1.40 ±0.39 (0.71-2.37)	4.01 ±1.49 (1.25-7.36)
Парамастиготы	5.12 ±1.27 (3.42-7.51)	2.78 ±0.39 (1.89-3.72)	1.27 ±0.20 (0.87-1.64)	2.55 ±0.44 (1.71-3.88)	1.40 ±0.39 (0.71-2.37)	4.01 ±1.49 (1.25-7.36)

Ультратонкая организация клеток *A. deanei* в кишечнике хозяина не отличается от таковой для клеток в культуре. Жгутиконосцы несут характерные для подсем. Strigomonadinae признаки: крупный рыхлый кинетопласт (рис. 14 А, В), цитоплазматических бактериальных симбионтов в симбионтофорных вакуолях (рис. 12 Н, I; рис. 14 А-С, F, H), нерегулярно расположенные микротрубочки тубулеммы, которые перемежаются ветвями митохондрия (рис. 14 F). Параксиальный тяж отсутствует, за исключением расширенного основания жгутика, где можно отметить эту структуру в редуцированном виде (рис. 14 D-E). Так же мы отмечали контрактильную вакуоль, которая посредством длинного канала связана со жгутиковым карманом (рис. 14 G)

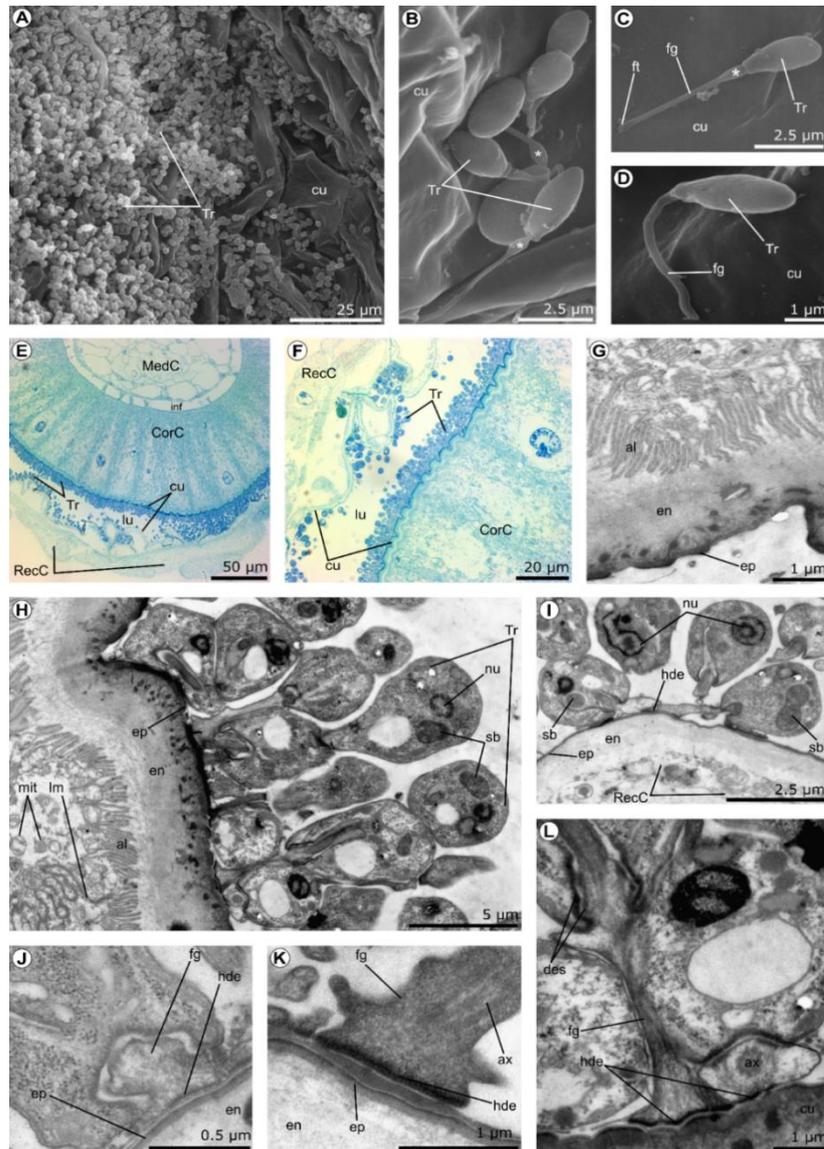


Рис. 12. Заражение *A. deanei* MN в ректуме *L. sericata*. A-D – СЭМ-микрофотографии клеток *A. deanei*, прикрепленных к кутикуле прямой кишки хозяина. Расширенные основания жгутиков отмечены звездочками; E-F – фрагмент поперечного полутонкого среза инфицированного ректума в области ректальной железы (окраска метиленовым синим, BF); G – интактная кутикула ректума *L. sericata* (ТЭМ); H – скопление прикрепленных жгутиков на основании желез прямой кишки (ТЭМ); I-L – различные варианты прикрепления жгутика трипаносоматид к эпикутикуле (ТЭМ).
 al – апикальные ламеллы; ax – аксонема; CorC – клетки кортикального эпителия; cu – кутикула ректума; des – десмосомоподобные контакты; en – эндокутикула; ep – эпикутикула; fg – жгутик; ft – кончик жгутика; hde – десмосомо-подобные контакты; inf – инфундибулюм; lm – латеральные плазматические мембраны кортикальных эпителиальных клеток; lu – просвет прямой кишки; MedC – медуллярные клетки; mit – митохондрии хозяйских клеток; RecC – клетки ректального эпителия; sb – бактериальный симбионт; Tr – трипаносоматиды.

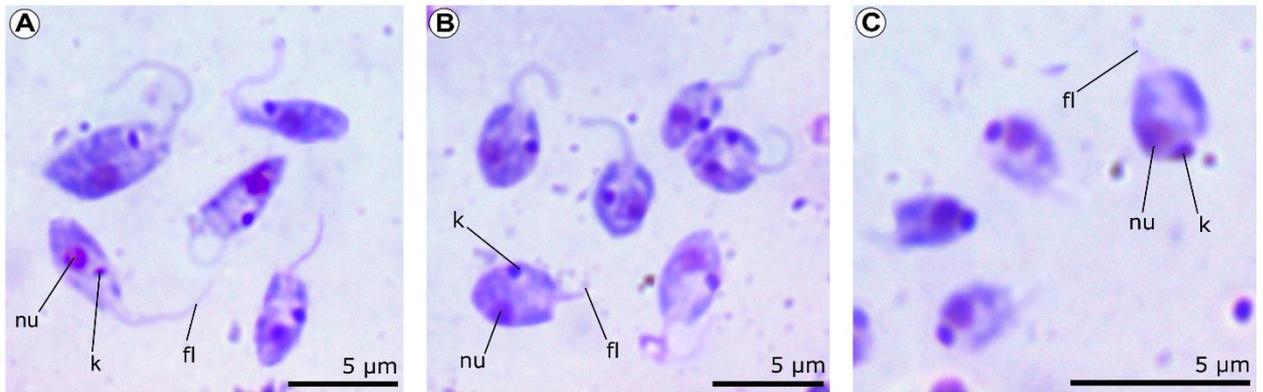


Рис. 13. Разнообразие морфотипов *A. deanei* в ректуме *L. sericata* А – промастиготы; В – пармастиготы; С – опистомастиготы. к – кинетоласт; с – эндосимбионт; я – ядро.

Клетки *A. deanei* из ректума хозяина характеризуются наличием цитостома (рис. 14 Н-И). В передней части жгутикового кармана располагается небольшая цитостомальная ямка, окруженная плотным материалом, который формирует преоральный валик. На дне цитостомальной ямки образуются небольшие везикулы. Рядом с цитостомом и сопряжённой с ним системой везикул располагаются микротрубочки.

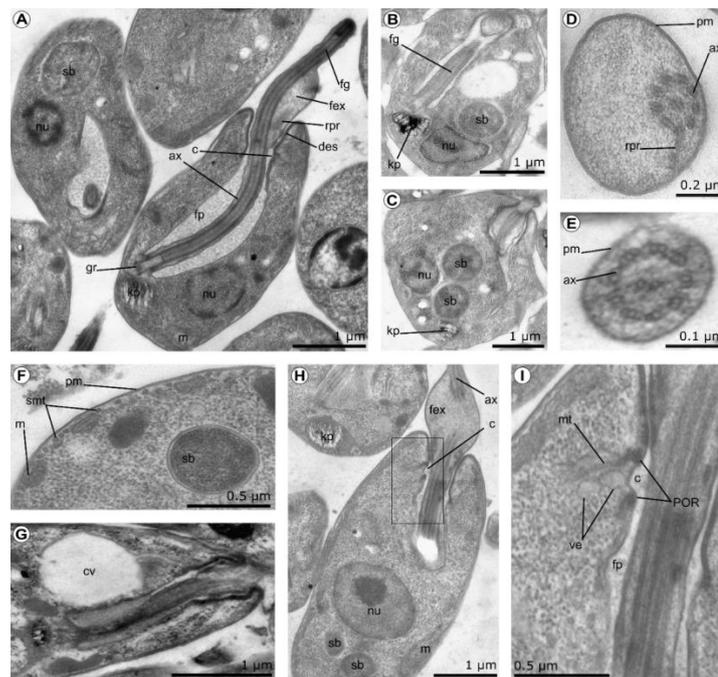


Рис. 14. Ультраструктура *A. deanei* MN в ректуме *L. sericata* (ТЭМ). А-С – продольный срез клетки; D – поперечный срез через основание жгутика; E – поперечный срез через дистальную часть жгутика; F – поперечный срез клетки; G – сократительная вакуоль; H – поперечный срез в области кармана жгутика и цитостома; I – цитостом *A. deanei* (увеличенный сегмент H).

ax – аксонема; с – цитостом; cv – сократительная вакуоль; des – десмосомоподобные контакты; fex – расширенная часть жгутиков; fg – жгутик; fp – жгутиковый карман; gr – гранула; kp – кинетоласт; m – митохондрия; nu – ядро; pm – плазматическая мембрана; POR – преоральный валик; rgr – редуцированный парафлагеллярный тяж; sb – бактериальный симбионт; smt – субпелликулярные микротрубочки; ve – пузырьки.

- Обсуждение

Одна из особенностей *Angomonas deanei*, определяющая интерес исследователей, – это его необычайно широкая гостальная специфичность. Впервые вид был описан из хищного клопа *Zelus leucogrammus* (Hemiptera, Reduviidae) в Южной Америке (Бразилия) (Carvalho, 1973; Teixeira et al., 2011), однако позднее неоднократно обнаруживался в мухах сем. Calliphoridae и Sarcophagidae по всему свету: к настоящему времени этот вид отмечен в Африке (Гана, Кения), на Мадагаскаре, в Южной Америке (Бразилия, Эквадор), Европе (Болгария, Чехия, Турция), Центральной Азии (Монголия) и Папуа-Новой Гвинее. (Tůč et al., 2011; Borghesan et al., 2018). Полученный нами изолят *A. deanei* MN был обнаружен на севере Ленинградской области в кишечнике мухи *Lucilia sp.* На сегодняшний день эта находка соответствует самой северной границе ареала вида.

Однако вопрос об исходном хозяине *A. deanei* остаётся открытым. Известно, что клопы *Z. leucogrammus* питаются в основном двукрылыми насекомыми из семейств Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae (Carvalho, 1973), и могут заражаться трипаносоматидами из двукрылых в процессе поедания своих жертв (Carvalho, 1973). Аргументом в пользу того, что первичными хозяевами *A. deanei* являются мухи, служат данные о ныне установленном широком ареале этого вида трипаносоматид, значительно превосходящем ареал клопа *Z. leucogrammus*, который не выходит за пределы Южной Америки. И факт обнаружения *A. deanei* на северо-западе Ленинградской области также говорит в пользу этого предположения.

Нам экспериментально удалось показать, что *A. deanei* способен реализовывать свой жизненный цикл в ректуме имаго *Calliphora vicina* и *Lucila sericata*. Длительная инфекция мух связана с развитием паразитов в ректуме взрослых насекомых. Остальные отделы кишечника жгутиконосцы проходят транзитом. Следует отметить, что *A. deanei* довольно быстро достигает задней кишки имаго: уже в течение 1 часа мы обнаруживали клетки паразита в ректуме насекомого, а через 3 часа после заражения *A. deanei* полностью покидал переднюю и среднюю кишку. Между тем известна способность трипаносоматид с ректальной локализацией задерживаться в передних отделах кишечника на более долгий период: *Herpetomonas samuelpessoai* окончательно покидает пищевой резервуар и переднюю кишку *Musca domestica* только спустя 8 дней после начала инфекции (Hopperich et al., 1992).

Локализация в ректуме насекомых известна как для моноксенных, так и у диксенных трипаносоматид (Wallace, 1966; Molyneux, 1977; Schaub, 1992), и является весьма распространённым явлением среди трипаносоматид короткоусых двукрылых.

Показано, что многие виды предпочитают локализоваться непосредственно на ректальных железах насекомого (Molyneux, 1977; Schaub, 1992; Фролов и др, 2016). Исключение составляет *H. samuelpeessoai*, который предпочитает прикрепляться к кутикулярной выстилке в основаниях ректальных желёз, но не на них самих (Hupperich et al., 1992). Наши результаты показывают, что клетки *A. deanei* формирует «ворсовое покрытие» по всей поверхности кутикулы ректума, однако крупные кластеры наблюдаются непосредственно в области ректальных желёз. Ректальные железы являются полифункциональным, но не очень хорошо исследованным органом. Известно, что у насекомых они играют важную роль в реабсорбции воды и солей (Gupta, Berridge, 1966), всасывания остаточных аминокислот (Wall, Oschman, 1975) и в выделении половых феромонов (Khoo, Tan, 2005).

Прикрепление к кутикуле хозяина осуществляется при помощи жгутика, причём в месте прикрепления со стороны жгутика формируются контакты полудесмосомального типа. Такой вариант закрепления для удержания в хозяине широко распространён среди трипаносоматид с ректальной локализацией (Molyneux 1977; Schaub 1992; Фролов и др., 2016; Lukeš et al., 2018). Считается, что прикрепление жгутиков к эпикутикуле может носить характер гидрофобного взаимодействия (Schmidt et al. 1998).

Морфология и ультраструктура *A. deanei* в культуре и кишечнике хозяина, в качестве которого мы использовали *L. sericata*, мало отличается от предыдущих описаний, выполненных на клетках из лабораторных культур (Freymuller, Camargo, 1981; Motta et al., 1997; Gadelha et al., 2005; Motta et al., 2010; Teixeira et al., 2011). Однако важной находкой является обнаружение цитостомальной ямки, сопряжённой с системой везикул. Данный комплекс можно охарактеризовать как редуцированный цитостом-цитофарингиальный комплекс (Frolov, Каргов, 1995). Вероятно, эта структура у *A. deanei* принимает активное участие во внутриклеточном транспорте, и, возможно, фаготрофном питании (Chasen et al., 2020). Ранее комплекс цитостом-цитофарингиальных органелл не был обнаружен при детальном ультраструктурном анализе стригомонадин (Vombaça et al., 2017; Loyola-Machado et al., 2017), и его существование ставилось под сомнение (Harmer et al., 2018). Возможно, что дальнейшие исследования этой структуры смогут пролить свет на функциональность цитостома стригомонадин. Не исключено, что эта структура могла играть важную роль в становлении бактериального симбиоза в этой группе трипаносоматид.

Известно, что некоторые моноксенные трипаносоматиды способны негативно воздействовать на своих хозяев-насекомых, в том числе, вызывая их гибель или снижая плодовитость (Bailey, Brooks, 1972a, b; Schaub, Schnitker, 1988; Schaub, Jensen, 1990;

Hamilton et al., 2015). Несмотря на высокую численность, которую образует *A. deanei* в кишечнике хозяина, мы не наблюдали снижения жизнеспособности или сокращение продолжительности жизни заражённых имаго в сравнении с контрольной группой. Так же мы не отмечали нарушений структуры кутикулы ректума в местах прикрепления жгутиков.

Таким образом, жизненный цикл *A. deanei* представляется простым и связан с пролиферацией клеток на поверхности кутикулы ректума. Нам не удалось обнаружить у *A. deanei* какие-либо специализированные расселительные стадии, характерные для ряда других моноксенных трипаносоматид (Schaub, Pretsch, 1981; Малышева, Фролов, 1995; Takata et al., 1996). Вероятнее всего передача инфекции осуществляется при питании мух на субстрате, контаминированном фекалиями заражённого насекомого, содержащими неспециализированные клетки *A. deanei*. Имаго каллифорид и саркофагид предпочитают питание на жидких и полужидких субстратах (Артамонов, 2011), что может обеспечивать более или менее продолжительное сохранение жизнеспособности жгутиконосцев во внешней среде. Интересно, что ряд симбиотических бактерий из кишечника каллифорид, попадая на питательные субстраты с фекалиями насекомого, выделяют аттрактанты, которые привлекают других яйцекладущих самок (Chaudhury et al., 2010; Tomberlin et al., 2017). Подобная поведенческая особенность имаго может способствовать передаче *A. deanei* среди насекомых, которые образуют комплекс некрофагов/копрофагов на разлагающихся субстратах.

Успех передачи *A. deanei* через контаминированный субстрат подтверждается широким кругом его хозяев. В нашей работе мы экспериментально продемонстрировали, что *A. deanei* не является избирательным при выборе хозяев, и способен передаваться как минимум среди имаго трёх различных видов каллифорид: *C. vicina*, *L. sericata* и *P. terraenocae*. Косвенным подтверждением способности *A. deanei* реализовывать свой жизненный цикл в широком круге хозяев служит тот факт, что мухи *L. sericata* и *C. vicina* в средней полосе России зимуют исключительно на стадии личинки или куколки (Виноградова, 1991). Выше мы показали, что в личинках и пупариях насекомых этих видов *A. deanei* не развивается, а клетки паразитов полностью выводятся из кишки хозяина на фазе окончания питания. Вероятно, резервуаром для сохранения инфекции в период зимней диапаузы хозяев являются взрослые мухи из той же экологической ниши, зимующие на имагинальной стадии. Среди саркофагид средней части России таковые не известны, однако многие каллифориды вполне могут претендовать на эту роль (Виноградова, 1991).

Пока непонятно, способен ли *A. deanei* распространяться на другие таксономические группы насекомых, в том числе – на клопов. Изначально описанный из кишечника редувиидного клопа *Zelus leucogrammus* (Carvalho, 1973), он в дальнейшем ни разу не был обнаружен в представителях отр. Hemiptera. Такая ситуация не является уникальной: среди трипаносоматид нередки случаи, когда отдельный вид жгутиконосца был отмечен в насекомых из различных отрядов. *Herpetomonas samuelpessoai* в своё время так же был изолирован из клопа *Zelus sp.*, однако в дальнейшем был обнаружен только в двукрылых (Borghesan et al., 2013). Возможно, это случайный разовый пример, когда хищный клоп в результате питания заражённой жертвой становится хозяином паразита, присущего другой группе насекомых. В этом случае хищные гетероптеры, будучи активными хищниками, могут играть роль активного «коллекционера» паразитов своих жертв. Однако пока неясно, насколько часто среди таких случайных заражений могут возникать временные или же постоянные ассоциации «паразит-хозяин». Примером трипаносоматид, для которых характерна крайне широкая гостальная радиация, является палеарктический вид *Crithidia brevicula*. Эта трипаносоматида, по-видимому, является универсалом, способным заражать и реализовывать свой жизненный цикл в клопах семейств Nabidae, Gerridae и (нехищные) Miridae (Малышева, Фролов, 1995), а также различных двукрылых: комаров *Culex spp.* (Schoener et al., 2018) и мух семейств Calliphoridae, Muscidae, Heleomyzidae, Sepsidae и Antomyiidae.

Вопрос о том, почему *A. deanei* не развивается в личинках *L. sericata*, остается открытым. Личинкам многих видов мух и, в частности, каллифорид, свойственно образовывать массовые скопления, что гипотетически должно способствовать успешной передаче инфекции (Boulay et al., 2013). Между тем, в литературе известны случаи успешного заражения личинок брахицер и трансфазной передачи инфекции, несмотря на комплексные метаболические перестройки хозяина. Показано, что *Jaenimonas drosophilae* образует крупные скопления в средней кишке личинок *Drosophila falleni* и сохраняется во время метаморфоза в жёлтотом теле – скоплении клеток личиночной кишки (Hamilton et al., 2015). Так же отмечено, что двужгутиковая трипаносоматида, описанная как «*H. muscarum*», которая способна оккупировать среднюю кишку личинок *Hipellates pusio* (Bailey, Brooks, 1972a, b). В дальнейшем они пенетрируют стенку кишки и проникают в гемоцель хозяина. Часть таких заражённых личинок гибнет, однако часть претерпевает метаморфоз с сохранением инфекции. Оба этих паразита – *J. drosophilae* и «*H. muscarum*» способны к трансфазной передаче, и влияют на успех дальнейшего развития имаго (Bailey, Brooks, 1972a, b; Hamilton et al., 2015).

У нас имеется две основных гипотезы, почему *A. deanei* способен лишь непродолжительное время персистировать в кишечнике личинок каллифорид. Первая гипотеза связана с действием антимикробных пептидов и многообразия иммунных путей насекомых (Hu, Aksoy, 2006; Hamilton et al., 2015), которые могут подавлять развитие инфекции. Второе предположение, кажущееся нам наиболее вероятным, основывается на том, что личинки брахицер имеют отличное от взрослых строение задней кишки: она представляет собой вытянутую трубку, которая не имеет выраженного расширения и лишена ректальных желёз (Fox et al., 2010). Вероятно, именно неспособность закрепиться в кишке личинки из-за её анатомических особенностей вкупе с физико-биохимическими условиями, отличными от условий во взрослой кишке, и являются основной причиной, по которой инфекция *A. deanei* не развивается в пищеварительном тракте личинок.

Выводы

1) Исследованные нами 4 штамма, относящиеся к р. *Wallaceina* (*W. ravinae*, *W. collosoma*, *W. rigidus* и штамм WSD) не имеют бактериальных эндосимбионтов и не относятся к симбионт-содержащим видам трипаносоматид. Комплекс морфологических особенностей, встречающийся у видов р. *Wallaceina* и симбионтсодержащих трипаносоматид подсем. Strigomonadinae (нерегулярная/септированная тубулема, прерываемая ветвями митохондрия, редуцированный парафлагеллярный тяж и относительно рыхлый кинетопласт), появляются в этих группах независимо.

2) Симбиотические ассоциации с прокариотными цитобионтами могут независимо возникать у представителей разных, в том числе неродственных филогрупп трипаносоматид. Морфологические и ультраструктурные исследования показывают, что эндосимбионты присутствуют в цитоплазме некоторых видов в пределах рр. *Vickermania* и *Phytomonas*.

3) Существование двух популяций *Phytomonas borealis*, одна из которых является симбионт-содержащей, а вторая – апосимбионтной, указывает на необязательный характер симбиотических отношений жгутиконосца с бактериями. Непостоянное число эндосимбионтов в клетках фитомонад вкупе с регуляцией численности бактерий со стороны хозяина при участии лизосом свидетельствуют о недавно сформировавшейся симбиотической ассоциации.

4) Ареал симбионт-содержащих стригомонадин *Angomonas deanei* и *A. desouzai*, описанных ранее в тропических и экваториальных регионах, распространяется на северные широты умеренного пояса Евразии. Широкая распространённость и отсутствие строгой гостальной специфичности *A. deanei* и *A. desouzai* (выявленное при помощи

молекулярного штрихкодирования и подтверждённое экспериментальными заражениями) лежат в основе крайне успешной стратегии, которая связана с расширением ареала за счёт активного освоения новых хозяев.

Список публикаций по теме работы

- Статьи:

1. Ганюкова А. И., Малышева М. Н., Фролов А. О. *Angomonas deanei* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) из мухи *Lucilia sp.* (Diptera: Calliphoridae): описание и культивирование нового штамма // Паразитология. – 2017. – Т. 51. – С. 5.

2. Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Ganyukova, A. I., Yurchenko, V., and Kostygov, A. Y. Life cycle of *Blastocrithidia papi* sp. n. (Kinetoplastea, Trypanosomatidae) in *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae) //European journal of protistology. – 2017. – Т. 57. – С. 85-98.

3. Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Ganyukova, A. I., Yurchenko, V., and Kostygov, A. Y. Obligate development of *Blastocrithidia papi* (Trypanosomatidae) in the Malpighian tubules of *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera) and coordination of host-parasite life cycles //Plos One. – 2018. – Т. 13. – №. 9. – С. e0204467.

4. Ganyukova, A. I., Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Spodareva, V. V., Yurchenko, V., and Kostygov, A. Y. A novel endosymbiont-containing trypanosomatid *Phytomonas borealis* sp. n. from the predatory bug *Picromerus bidens* (Heteroptera: Pentatomidae) //Folia parasitologica. – 2020. – Т. 67. – С. 1-8.

5. Ganyukova A. I., Malysheva M. N., Frolov A. O. Life cycle, ultrastructure and host-parasite relationships of *Angomonas deanei* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) //Protistology. – 2020. – Т. 14. – №. 4. – С. 204-218.

6. Kostygov, A. Y., Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Ganyukova, A. I., Chistyakova, L. V., Tashyreva, D., ... & Yurchenko, V. *Vickermania* gen. nov., trypanosomatids that use two joined flagella to resist midgut peristaltic flow within the fly host //BMC biology. – 2020. – Т. 18. – №. 1. – С. 1-16.

7. Ganyukova A. I., Malysheva M. N., Frolov A. O. Experimental infection of the fly *Calliphora vicina* with the trypanosomatid *Angomonas deanei* and cross-infection between different calliphorid species //Protistology. – 2021. – Т. 15. – №. 2. – С. 88-95.

- Тезисы:

1. Ganyukova, A.I., Malysheva, M.N., Kostygov, A.Y., Frolov, A.O. *Blastocrithidia papi* and *Leptomonas pyrrhocoris* (Trypanosomatidae) in the true bug *Pyrrhocoris apterus* (Pyrrhocoridae): two different life cycle strategies. // TryTax2 Meeting, Ostrava. – 2016.

2. Золотарев А.В., Ганюкова А.И., Малышева М.Н., Фролов А.О. Особенности географического распространения моноксенных трипаносоматид *Angomonas deanei* в северных регионах Евразии. // VI Съезд Паразитологического общества., Санкт-Петербург. – 2018.

3. Ganyukova A., Malysheva M., Zolotarev A., Kostygov A., Frolov A. *Angomonas deanei* (Trypanosomatidae) life cycle in intestines of two fly species: *Calliphora vicina* and

Lucilia sericata (Brachycera, Calliphoridae). // 49th Jírovec's Protozoological Days, Kostelec nad Černými lesy. – 2019.

4. Days. Zolotarev A., Malysheva M., Frolov A., Ganyukova A. Trypanosomatids diversity is Northern Eurasia: who lives in taiga and tundra? // 49th Jírovec's Protozoological Days, Kostelec nad Černými lesy. – 2019.

A. Kostygov, A. Frolov, M. Malysheva, A. Ganyukova, V. Spodareva, D. Macedo, J. Králová, J. Lukeš, D. Tashyrevac, V. Yurchenko. A peculiar trypanosomatid lineage with biflagellated cells. // VIII European Congress of Protistology (ECOP), Rome. – 2019.

Список цитируемой литературы:

1. Артамонов С. Д. Особенности экологии каллифорид (Diptera: Calliphoridae) Дальнего Востока России // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. – 2011. – №. 22. – С. 159-166.
2. Виноградова Е. Б. Диапауза мух и ее регуляция // Труды Зоологического института АН СССР. – 1991. – Т. 214. – С. 255.
3. Костыгов А. Ю., Фролов А. О. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock, 1914: лептомонас или бластокритидия // Паразитология. – 2007. – Т. 41. – №. 2. – С. 126-136.
4. Малышева М. Н., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Leptomonas repentinus* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)—паразита клопа-водомерки *Gerris rufoscutellatus* // Паразитология. – 2002. – Т. 36. – №. 4. – С. 286-294.
5. Малышева М. Н., Фролов А. О. Цикл развития жгутиконосца *Proteomonas brevicula* (Trypanosomatidae) в хищных клопах семейства Nabidae (Hemiptera) // Паразитология. – 1995. – Т. 29. – №. 4. – С. 289-297.
6. Подлипаев С. А., Фролов А. О. описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) // Паразитология. – 1987. – Т. 21. – №. 4. – С. 545-552.
7. Фролов А. О., Малышева М. Н. Описание *Phytomonas nordicus* n. sp. (Trypanosomatidae) из хищного клопа *Troilus luridus* (Hemiptera: Pentatomidae) // Паразитология. – 1993. – Т. 27. – №. 3. – С. 227-232.
8. Фролов А. О., Малышева М. Н., Костыгов А. Ю. Трансформации жизненных циклов в эволюционной истории трипаносоматид. Макротрансформации // Паразитология. – 2015. – Т. 49. – №. 4. – С. 233-256.
9. Фролов А. О., Малышева М. Н., Костыгов А. Ю. Трансформации жизненных циклов в эволюционной истории трипаносоматид. Эндотрансформации и aberrации // Паразитология. – 2016. – Т. 50. – №. 2. – С. 97-113.
10. Фролов А. О., Подлипаев С. А. Необычный способ формирования инвазионных стадий у *Leptomonas rigidus* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) // Паразитология. – 1996. – Т. 30. – №. 6. – С. 473-477.
11. Bailey C. H., Brooks W. M. Effects of *Herpetomonas muscarum* on development and longevity of the eye gnat, *Hippelates pusio* (Diptera: Chloropidae) // Journal of invertebrate pathology. – 1972b. – Т. 20. – №. 1. – С. 31-36.
12. Bailey C. H., Brooks W. M. Histological observations on larvae of the eye gnat, *Hippelates pusio* (diptera: Chloropidae), infected with the flagellate *Herpetomonas muscarum* // Journal of invertebrate pathology. – 1972a. – Т. 19. – №. 3. – С. 342-353.

13. Bombaça A. C. S. et al. Hydrogen peroxide resistance in *Strigomonas culicis*: Effects on mitochondrial functionality and *Aedes aegypti* interaction //Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – T. 113. – C. 255-266.
14. Borghesan T. C. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships of coevolving symbiont-harboring insect trypanosomatids, and their Neotropical dispersal by invader African blowflies (Calliphoridae) //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 131.
15. Borghesan T. C. et al. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies //Protist. – 2013. – T. 164. – №. 1. – C. 129-152.
16. Boulay J. et al. Evidence of active aggregation behaviour in *Lucilia sericata* larvae and possible implication of a conspecific mark //Animal behaviour. – 2013. – T. 85. – №. 6. – C. 1191-1197.
17. Carvalho A. L. M. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanossomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus*. Belo Horizonte, 1973: дис. – Tese de mestrado. Univ. Fed. Minas Gerais, 1973.
18. Chasen N. M., Coppens I., Etheridge R. D. Identification and localization of the first known proteins of the *Trypanosoma cruzi* cytostome cytopharynx endocytic complex //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2020. – T. 9. – C. 445.
19. Chaudhury M. F. et al. Volatiles emitted from eight wound-isolated bacteria differentially attract gravid screwworms (Diptera: Calliphoridae) to oviposit //Journal of Medical Entomology. – 2010. – T. 47. – №. 3. – C. 349-354.
20. Fox D. T., Gall J. G., Spradling A. C. Error-prone polyploid mitosis during normal *Drosophila* development //Genes & development. – 2010. – T. 24. – №. 20. – C. 2294-2302.
21. Freymuller E. et al. Ultrastructural studies on the trypanosomatid *Phytomonas serpens* in the salivary glands of a phytophagous hemipteran //The Journal of protozoology. – 1990. – T. 37. – №. 3. – C. 225-229.
22. Freymuller E., Camargo E. P. Ultrastructural differences between species of Trypanosomatids with and without Endosymbionts //The Journal of protozoology. – 1981. – T. 28. – №. 2. – C. 175-182.
23. Frolov A. O. et al. Back to monoxeny: *Phytomonas nordicus* descended from dixenous plant parasites //European journal of protistology. – 2016. – T. 52. – C. 1-10.
24. Frolov A. O. et al. Development of *Phytomonas lipae* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in the true bug *Coreus marginatus* (Heteroptera: Coreidae) and insights into the evolution of life cycles in the genus *Phytomonas* //Plos One. – 2019. – T. 14. – №. 4. – C. e0214484.
25. Frolov A. O., Karpov S. A. Comparative morphology of kinetoplastids //Tsitologiya. – 1995. – T. 37. – №. 11. – C. 1072-1096.
26. Frolov A. O., Kostygov A. Y., Yurchenko V. Development of monoxenous trypanosomatids and phytomonads in insects //Trends in Parasitology. – 2021.
27. Gadelha C. et al. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa //Eukaryotic cell. – 2005. – T. 4. – №. 3. – C. 516-525.
28. Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood //Systematic biology. – 2003. – T. 52. – №. 5. – C. 696-704.
29. Gupta B. L., Berridge M. J. Fine structural organization of the rectum in the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.) with special reference to connective tissue, tracheae and neurosecretory innervation in the rectal papillae //Journal of morphology. – 1966. – T. 120. – №. 1. – C. 23-81.

30. Hamilton P. T. et al. Infection dynamics and immune response in a newly described *Drosophila*-trypanosomatid association //MBio. – 2015. – T. 6. – №. 5. – C. e01356-15.
31. Harmer J. et al. Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution //Parasitology. – 2018. – T. 145. – №. 10. – C. 1311-1323.
32. Hoare C. A. et al. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. //The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. – 1972.
33. Hu C., Aksoy S. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* //Molecular microbiology. – 2006. – T. 60. – №. 5. – C. 1194-1204.
34. Hupperich K., Camargo E. P., Milder R. Ultrastructural study of the host-parasite relationship of trypanosomatids in the housefly //Parasitology research. – 1992. – T. 78. – №. 1. – C. 48-55.
35. Jankevicius J. V. et al. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes //The Journal of protozoology. – 1989. – T. 36. – №. 3. – C. 265-271.
36. Jaskowska E. et al. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments //PLoS pathogens. – 2015. – T. 11. – №. 1. – C. e1004484.
37. Khoo C. C. H., Tan K. H. Rectal gland of *Bactrocera papayae*: ultrastructure, anatomy, and sequestration of autofluorescent compounds upon methyl eugenol consumption by the male fruit fly //Microscopy research and technique. – 2005. – T. 67. – №. 5. – C. 219-226.
38. Kostygov A. Y. et al. Molecular revision of the genus *Wallaceina* //Protist. – 2014. – T. 165. – №. 5. – C. 594-604.
39. Kostygov A. Y. et al. Novel trypanosomatid-bacterium association: evolution of endosymbiosis in action //MBio. – 2016. – T. 7. – №. 2. – C. e01985-15.
40. Kostygov A. Y. et al. *Vickermania* gen. nov., trypanosomatids that use two joined flagella to resist midgut peristaltic flow within the fly host //BMC biology. – 2020. – T. 18. – №. 1. – C. 1-16.
41. Kozminsky E. et al. Host-specificity of monoxenous trypanosomatids: statistical analysis of the distribution and transmission patterns of the parasites from Neotropical Heteroptera //Protist. – 2015. – T. 166. – №. 5. – C. 551-568.
42. Loyola-Machado A. C. et al. The symbiotic bacterium fuels the energy metabolism of the host trypanosomatid *Strigomonas culicis* //Protist. – 2017. – T. 168. – №. 2. – C. 253-269.
43. Lukeš J. et al. Characterization of a new cosmopolitan genus of trypanosomatid parasites, *Obscuromonas* gen. nov. (Blastocrithidiinae subfam. nov.) //European Journal of Protistology. – 2021. – T. 79. – C. 125778.
44. Lukeš J. et al. Trypanosomatids are much more than just trypanosomes: clues from the expanded family tree //Trends in parasitology. – 2018. – T. 34. – №. 6. – C. 466-480.
45. Malysheva M. N. et al. Culture collection of parasitic protists at the Zoological Institute RAS (CCPP ZIN RAS) //Protistology. – 2016. – T. 10. – №. 1.
46. Molyneux D. H. Vector relationships in the Trypanosomatidae //Advances in parasitology. – 1977. – T. 15. – C. 1-82.
47. Motta M. C. et al. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont //European journal of cell biology. – 1997. – T. 72. – №. 4. – C. 370-377.
48. Motta M. C. M. et al. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus //PLoS One. – 2010. – T. 5. – №. 8. – C. e12415.

49. Panizzi A. R. et al. Stink bugs (Pentatomidae) In: Schaefer CW, Panizzi AR, editors. Heteroptera of Economic Importance. – 2000.
50. Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears //International journal for parasitology. – 2001. – T. 31. – №. 5-6. – C. 648-652.
51. Ronquist F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space //Systematic biology. – 2012. – T. 61. – №. 3. – C. 539-542.
52. Saulich A. K., Musolin D. L. Seasonal cycles in stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone: diversity and control //Entomological Review. – 2014. – T. 94. – №. 6. – C. 785-814.
53. Schaub G. A., Jensen C. Developmental time and mortality of the reduviid bug *Triatoma infestans* with differential exposure to coprophagic infections with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) //Journal of invertebrate pathology. – 1990. – T. 55. – №. 1. – C. 17-27.
54. Schaub G. A., Pretschi M. Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1981. – T. 75. – №. 1. – C. 168-171.
55. Schaub G. A., Schnitker A. Influence of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the reduviid bug *Triatoma infestans*: alterations in the Malpighian tubules //Parasitology research. – 1988. – T. 75. – №. 2. – C. 88-97.
56. Schmidt J., Kleffmann T., Schaub G. A. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans* //Parasitology research. – 1998. – T. 84. – №. 7. – C. 527-536.
57. Schoener E. et al. Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes //PloS one. – 2018. – T. 13. – №. 4. – C. e0196052.
58. Schuh R. T., Slater J. A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history. – Cornell University press, 1995.
59. Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., de Graaf, D. C. and Evans, J. D. 2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. J. Eukaryot. Microbiol., 62, 567–583.
60. Seward E. A. et al. Description of *Phytomonas oxycareni* n. sp. from the salivary glands of *Oxycarenum lavaterae* //Protist. – 2017. – T. 168. – №. 1. – C. 71-79.
61. Svobodová M. et al. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera) //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2007. – T. 57. – №. 2. – C. 423-432.
62. Takata C. S. A., Camargo E. P., Milder R. V. Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas* //European Journal of Protistology. – 1996. – T. 32. – №. 1. – C. 90-95.
63. Teixeira M. M. G. et al. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts //Protist. – 2011. – T. 162. – №. 3. – C. 503-524.
64. Tomberlin J. K. et al. A review of bacterial interactions with blow flies (Diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance //Annals of the Entomological Society of America. – 2017. – T. 110. – №. 1. – C. 19-36.

65. Týč J. et al. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity //Molecular phylogenetics and evolution. – 2013. – T. 69. – №. 1. – C. 255-264.
66. Vinogradova E. B., Reznik S. Y. The rate of preimaginal development of the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) under field and laboratory conditions //Entomological review. – 2013. – T. 93. – №. 5. – C. 533-539.
67. Votýpka J. et al. Endangered monoxenous trypanosomatid parasites: a lesson from island biogeography //Biodiversity and Conservation. – 2020. – T. 29. – №. 13. – C. 3635-3667.
68. Votýpka J. et al. How monoxenous trypanosomatids revealed hidden feeding habits of their tsetse fly hosts //Folia Parasitologica. – 2021. – T. 68. – C. 019.
69. Votýpka J. et al. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n //Protist. – 2014. – T. 165. – №. 6. – C. 825-838.
70. Wall B. J., Oschman J. L. Structure and function of the rectum in insects //Fortschr. Zool. – 1975. – T. 23. – №. 2-3. – C. 193-222.
71. Wallace, F. G. / F. G. Wallace//Exp. Parasitol. — 1966. —V. 18. — № 1. — P. 124—193.
72. Zanetti A. et al. *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae): phylogenetic analyses support infrageneric lineages and a new species transmitted to Solanaceae fruits by a pentatomid hemipteran //European journal of protistology. – 2016. – T. 56. – C. 232-249.