

Ганюкова Анна Игоревна

Симбионт-содержащие трипаносоматиды: жизненные циклы, разнообразие симбиотических ассоциаций, филогения

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

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

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Фролов Александр Олегович**

**Официальные оппоненты:** **Тихоненков Денис Викторович**  
доктор биологических наук, Федеральное  
государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д.  
Папанина Российской академии наук,  
главный научный сотрудник

**Насонова Елена Станиславовна,**  
кандидат биологических наук, Федеральное  
государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской академии наук,  
ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Российский государственный педагогический  
университет им. А. И. Герцена»

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2023 г. в « \_\_\_ » часов на заседании диссертационного  
совета 24.1.026.01 на базе Зоологического института РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург,  
Университетская наб., д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института РАН:  
<https://www.zin.ru/boards/24.1.026.01/theses.html>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Ахметова Лилия Агдасовна

### Общая характеристика работы

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время жгутиконосцы семейства *Trypanosomatidae* представляют одну из важнейших в практическом отношении групп паразитических протистов. Трипаносоматиды – одни из немногих паразитов, которые в процессе своего эволюционного пути смогли освоить огромный круг хозяев, включающий все классы позвоночных животных, кольчатых червей, насекомых и высшие растения (Frolov et al., 2021). Многие трипаносоматиды известны как опасные патогены: в их числе протисты родов *Trypanosoma* и *Leishmania*, которые являются причиной тяжелых заболеваний человека (сонной болезни, кала-азара, болезни Чагаса, кожных лейшманиозов и многих других), а жгутиконосцы рода *Phytomonas* известны как возбудители болезней культурных растений: масличной и кокосовой пальм, кофе, маниоки, etc. (Camargo, 1999).

На сегодняшний день эта группа протистов находится на «эволюционном подъеме», о чём прямо и косвенно свидетельствуют многочисленные факты. В настоящее время трипаносоматиды активно осваивают новых хозяев, и вслед за ними распространяются на новые территории. Не в последнюю очередь это связано 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). Другой аспект – это предполагаемая высокая скорость образования новых паразито-хозяинных систем трипаносоматидами. Начиная с конца прошлого века стали появляться сообщения о том, что моноксенные трипаносоматиды, чьи жизненные циклы связаны исключительно с насекомыми, могут вызывать оппортунистические инфекции у человека (Dedet et al., 1995; Pacheco et al., 1998; Dedet, Pratlong, 2000; Garin et al., 2001; Chicharro, Alvar, 2003).

Одним из важных факторов, расширяющих адаптивный потенциал паразитов и открывающих новые перспективы в их борьбе за ресурсы, является их способность вступать в симбиотические отношения с прокариотными микроорганизмами. Варианты взаимодействий подобного рода распространены среди трипаносоматид: ряд видов образует тесные симбиотические ассоциации с бетапротеобактериями (Teixeira et al., 2011, 2013; Votýpka, et al., 2014; Kostygov et al., 2016). Такие взаимоотношения оказывают влияние на метаболизм, ультраструктуру, геномы и клеточные циклы обоих членов ассоциаций, а также напрямую влияют на способность жгутиконосцев колонизировать кишечник насекомого-хозяина (Fampa et

al., 2003; d'Avila-Levy et al., 2005; Catta-Pretta et al., 2013; Alves et al., 2011; Alves et al., 2013 a, b; Klein et al., 2013; Morales et al., 2016; Kostygov et al., 2017; Skalický et al., 2021; Zacharova et al., 2021).

Между тем, ключевые вопросы, связанные с разнообразием симбионтсодержащих трипаносоматид, оценкой их географического распространения, жизненными циклами и способами передачи между насекомыми-хозяевами, а также влиянием симбиоза с прокариотными организмами на эволюцию семейства *Trypanosomatidae* в современных условиях, до сих пор остаются открытыми.

**Степень разработанности темы исследования.** Тема, рассматриваемая в настоящем исследовании, является актуальной и широко обсуждаемой в современных исследованиях. Тем не менее, подавляющее большинство исследований сконцентрировано в основном на вопросах метаболизма и геномах уже известных видов симбионтсодержащих трипаносоматид. Многочисленные широкомасштабные фаунистические работы в последние годы основываются исключительно на молекулярном штрихкодировании образцов, полученных «вслепую», и главным образом связаны с регионами Афро- и Неотропиков.

Таким образом, среди работ последних лет практически не встречается описаний новых симбионтсодержащих видов трипаносоматид. Современные представления о разнообразии симбиотических ассоциаций в пределах семейства чётко очерчены уже существующими таксонами, поэтому поиск симбионтов среди групп, представители которых традиционно считаются «апосимбионтными», не ведётся. Кроме того, преобладание в современных фаунистических исследованиях методов молекулярного штрихкодирования приводит к возникновению огромных пробелов в вопросах биологии, ультраструктуры, паразито-хозяйинных отношений симбионт-содержащих видов трипаносоматид.

Настоящее исследование было призвано восполнить хотя бы часть пробелов в изучении упомянутой проблемы.

**Цели и задачи работы.** Среди основных целей настоящей работы мы выделяли:

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

Для достижения указанных целей были поставлены следующие задачи:

1. Поиск симбионт-содержащих трипаносоматид среди штаммов коллекции банка культур (в т.ч. – штаммов рода *Wallacemonas*) и архивных препаратов ЗИН РАН с использованием методов флуоресцентной микроскопии и молекулярного штрихкодирования;

2. Поиск симбионт-содержащих трипаносоматид в природных популяциях хозяев с использованием методов флюоресцентной микроскопии и молекулярного штрихкодирования;
3. Постановка экспериментов по искусственному заражению для изучения жизненных циклов симбионт-содержащих трипаносоматид;
4. 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.

До последнего времени симбиоз с бетапротеобактериями рода *Ca. Kinetoplastibacterium* считался уникальным событием в эволюционной истории трипаносоматид, с которым связывалось происхождение подсемейства Strigomonadinae. Обнаружение альтернативной симбиотической ассоциации (*Novymonas esmeraldas/Ca. Pandoraea novymonadis*) у представителя подсемейства Leishmaniinae поставило под сомнение такое утверждение и сделало вероятной гипотезу, согласно которой симбиотические ассоциации с прокариотными организмами могут возникать независимо у представителей разных таксонов трипаносоматид, и имеют при этом различные эволюционные последствия. Наши находки прокариотных цитобионтов у трипаносоматид из совершенно неродственных родов *Phytomonas* и *Vickermania* являются подтверждением этой гипотезы.

Существующие взгляды на происхождение и разнообразие симбиотических ассоциаций трипаносоматид и прокариотных цитобионтов во многом искажены за счет исторически сложившегося «ассиметричного» изучения группы. Можно говорить о трёх основных проблемах, 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, – целенаправленный поиск симбионт-содержащих видов среди представителей всех родов моноксенных трипаносоматид и диксенных паразитов растений, позволило нам обнаружить новые симбионт-содержащие виды.

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. Нам удалось не

только обнаружить симбионт-содержащие виды трипаносоматид – паразитов двукрылых насекомых, но также экспериментально доказать возможность реализации жизненного цикла и успешную внутри- и межвидовую трансмиссию *Angomonas deanei* у мух семейства Calliphoridae.

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 двоякое 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 провели оценку биоразнообразия трипаносоматид, выделенных из насекомых бореальной зоны Европы (от Карелии до Камчатки), и впервые выявили симбионт-содержащие виды трипаносоматид в этом регионе.

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

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

**Методология и методы исследования.** При подготовке настоящей работы применялись разнообразные методы, широко используемые в современных паразитологических исследованиях. Среди них:

- Методы сбора полевых материалов и их первичной обработки (ловля и вскрытие насекомых);

- Морфологические методы, связанные с приготовлением и микроскопическим исследованием временных препаратов и мазков клеток трипаносоматид с применением методов световой микроскопии (световая микроскопия, флюоресцентная микроскопия), а также проведением измерений и анализом морфометрических параметров;
- Методы трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (пробоподготовка и фиксация образцов);
- Методы культивирования трипаносоматид: выделение, очистка, криоконсервация лабораторных культур;
- Эксперименты, связанные с моделированием жизненных циклов моноксенных трипаносоматид в насекомых-хозяевах: культивирование насекомых, заражение насекомых, вскрытие и фиксация инфицированных тканей;
- Методы молекулярной биологии, такие как выделение ДНК, ПЦР, гель-электрофорез и секвенирование ДНК, анализ нуклеотидных последовательностей;
- Молекулярно-филогенетические методы, связанные с выравниванием последовательностей и реконструкцией филогении.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Трипаносоматиды рода *Wallacemonas* не имеют симбионтов, несмотря на комплекс синапоморфий подсемейства Strigomonadinae. Характерные признаки подсемейства Strigomonadinae появляются в этой группе либо независимо, либо вследствие дивергенции и последовавшей утраты симбионтов.
- 2) помимо трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae и рода *Novymonas*, симбионт-содержащие виды встречаются среди жгутиконосцев родов *Vickermania* и *Phytomonas*.
- 3) симбиотическая ассоциация *Phytomonas borealis* с их бактериальными эндосимбионтами возникла недавно и находится в процессе становления.
- 4) ареал рода *Angomonas* охватывает не только тропические и экваториальные зоны, но также северные широты умеренной зоны Евразии, что является результатом относительно простого жизненного цикла и отсутствия строгой гостальной специфичности.
- 5) Активные процессы диверсификации рода *Angomonas* протекали не только в тропических регионах Африки и Южной Америки, но и в северных регионах Европы.

**Степень достоверности и апробация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Из них 4 статьи в журналах, индексируемых SCOPUS и 2 статьи, индексируемые Web of Science Core Collection.

Основные положения работы были представлены на всероссийской конференции с международным участием «Современная паразитология — основные тренды и вызовы» (Санкт-

Петербург, 2018), международной конференции «49th Jirovec's Protozoological Days» (Чехия, Костелец над Черными лесы, 2019), международной конференции «VIII European Congress of Protistology» (Италия, Рим, 2019).

**Структура и объём работы.** Работа состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и списка литературы. Основная часть работы изложена на 110 страницах, содержит 21 рисунок и 19 таблиц. Список литературы включает 189 наименований, из которых 16 на русском языке, и 173 – на иностранных. Приложение к работе содержит 2 таблицы на 4 страницах.

**Благодарности.** Эта работа не была бы выполнена без содействия и помощи множества людей, которых мне бы хотелось поблагодарить. В первую очередь, я хотела бы поблагодарить моего научного руководителя, Александра Олеговича Фролова, за неоценимую помощь и поддержку в выполнении диссертационной работы, ценные советы, свободу выбора методик и экспериментов, а также безграничное терпение. Отдельную благодарность хотелось бы выразить Марине Николаевне Малышевой и Чистяковой Людмиле Валерьевне за помощь в работе с культурами, советы, консультации в освоении микроскопических методик, и моральную поддержку.

Я крайне признательна Алексею Юрьевичу Костыгову и Ольге Васильевне Бондаревой за консультации и помощь в освоении методов молекулярно-филогенетического анализа. Огромную благодарность я хотела бы выразить всем членам коллективов Лаборатории по изучению паразитических червей и протистов, Лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики и ЦКП «Таксон» за создание дружелюбной рабочей атмосферы. Отдельную признательность я выражаю руководителям этих подразделений: Кириллу Владимировичу Галактионову, Наталье Иосифовне Абрамсон, Семёну Юрьевичу Бодрову и Анне Алексеевне Намятовой.

Я крайне признательна сотруднику каф. энтомологии СПбГУ Александру Павловичу Несину за предоставление культур мух, консультации по их содержанию, биологии, распространению и развитию.

Также хочу выразить огромную благодарность Гите Георгиевне Паскеровой за бесценные наставления и советы.

Работа выполнена в рамках тем государственных заданий № АААА-А17-117030310322-3 и АААА-А19-119020690109-2 в лаборатории по изучению паразитических червей и протистов ЗИН РАН с использованием приборной базы ЦКП «Таксон». Исследования поддержаны грантами РФФИ № 18-04-00138 и № 19-34-90027.

## **Основное содержание работы**

### **Глава 1 Обзор литературных данных**

В данной главе приводятся литературные сведения об истории изучения семейства *Trypanosomatidae* и в частности – истории изучения симбионтсодержащих трипаносоматид. Проанализированы данные о современном биоразнообразии и распространении симбионтсодержащих трипаносоматид, также освещены вопросы становления симбиотических отношений в пределах семейства. Особое внимание уделено анализу литературы, касающейся вопросов морфологии, метаболизма, размножения, геномов и взаимодействий членов симбиотических ассоциаций.

### **Глава 2 Материалы и методы**

#### **2.1 Фаунистические сборы**

Авторские сборы были проведены в 8 регионах России: Ленинградской, Новгородской, Псковской областях, республиках Карелия и Коми, Ямало-Ненецком и Чукотском АО, а также в Камчатском крае, на протяжении полевых сезонов 2016-2021 гг. Насекомых усыпляли в парах хлороформа, после чего вскрывали в капле физиологического раствора и изолировали кишечник. Фрагменты кишечника и его содержимое изучали на прижизненных препаратах, при обнаружении инфекции препарат использовали для приготовления сухого мазка. Фрагменты кишечника, заражённые трипаносоматидами, помещали в пробирки со средами для культивирования. Всего было произведено 1347 вскрытий насекомых (главным образом – из отрядов *Diptera* и *Hemiptera*).

#### **2.2 Лабораторные культуры и архивные препараты**

Нами были получены 236 оригинальных культур, которые в настоящий момент поддерживаются в банке культур ЗИН РАН. Культуры трипаносоматид ведутся на лабораторных средах без раствора антибиотиков при температуре 22°C, с пересевом раз в 14 дней. Часть культур в настоящий момент заморожена и хранится при температуре -86 °C.

Помимо оригинальных культур, мы проанализировали 74 штамма трипаносоматид, которые были депонированы в банк культур ранее в различные годы, и 46 гистологических мазков из коллекции архивных препаратов.

#### **2.3 Исследование морфологии трипаносоматид**

Для изучения морфологии трипаносоматид мы использовали стандартные методики световой и электронной микроскопии. Сухие мазки культур и фрагменты кишечника насекомых фиксировали 96% этанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза (рН 6.8). Для визуализации

цитоплазматических бактерий-симбионтов и ДНК-содержащих органелл проводили окраску флюоресцентным красителем DAPI. Микрофотографии были получены на микроскопе Leica DM 2500, объектив HCX PL FLUOTAR 100X, с 14 Мпс USB камерой UCMOS14000KPA (Tour Tek, Hangzhou, China).

Ультратонкая организация клеток трипаносоматид в культуре и кишечнике хозяина была исследована с использованием сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Осаждённую культуру или фрагменты заражённого кишечника фиксировали в 2,5% глютаральдегиде с постфиксацией 4% OsO<sub>4</sub> и с последующим обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации и заливкой в смесь аралдита с эпоном. Ультратонкие срезы изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol 1400 (TEM). Поверхность жгутиконосцев была исследована с использованием сканирующего микроскопа Tescan Mira3 LMU.

#### 2.4 Выделение геномной ДНК, ПЦР и секвенирование

Геномная ДНК была выделена из культур и фрагментов заражённого кишечника насекомых при помощи набора для выделения ДНК PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Фрагмент гена COI насекомых амплифицировали для идентификации видовой принадлежности хозяина при помощи пары праймеров HCO12198 и LCO1490 (Folmer et al., 1994). Фрагмент гена 18S рРНК трипаносоматид амплифицировали при помощи специфичной пары праймеров S762-S763 (Kostygov et al., 2014). Фрагмент гена 16S рРНК бактериальных симбионтов трипаносоматид (из аксеничных культур) амплифицировали при помощи специфичной пары праймеров 680F-1486R (Teixeira et al., 2011). Полученные ПЦР-фрагменты выделяли из реакционной смеси и очищали с использованием набора Cleanup Standard (Евроген). ПЦР-фрагменты были отсековированы по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в НИО Евроген.

#### 2.5 Филогенетический анализ

Выравнивания последовательностей были подготовлены с использованием программного пакета MEGA7, при этом неоднозначно выровненные позиции редактировались вручную. Для построения филогенетических деревьев мы использовали полученные нами последовательности гена 18S рРНК трипаносоматид и гена 16S рРНК бактериальных симбионтов, а также последовательности, депонированные в базу GenBank.

Реконструкция деревьев по методу максимального правдоподобия была выполнена в IQ-TREE v.1.6 с лучшей эволюционной моделью, выбранной с использованием байесовского информационного критерия встроенным ModelFinder для каждого дерева. Байесовский анализ

был выполнен в MrBayes v.3.2.7. Дерево, построенное для гена 16S рРНК бактериальных симбионтов, было реконструировано по методу присоединения соседей в программе MEGA7.

## 2.6 Экспериментальные заражения

Для изучения жизненного цикла и гостальной специфичности жгутиконосцев *Angomonas deanei* и *Novomonas esmeraldas* мы провели ряд экспериментов. В качестве экспериментальных хозяев мы использовали насекомых из лабораторных культур трёх видов мух: *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata* и *Protophormia terraenovae*.

Заражение личинок *L. sericata* и *C. vicina* проводили на полужидком субстрате, к которому была добавлена культура жгутиконосцев. Заражение проводили по двум схемам: (1) при кратковременном заражении однодневных личинок в течение суток содержали на заражённом субстрате, после чего отмывали в дистиллированной воде и переносили на незаражённый субстрат; (2) при длительном непрерывном заражении однодневных личинок помещали на заражённый субстрат, который обновляли ежедневно до момента пупаризации насекомых.

Взрослых мух перед заражением сутки содержали без воды и пищи, после чего предлагали насекомому каплю культуры жгутиконосцев. Момент, когда муха заканчивала пить, определялся как точка отсчёта с момента заражения. В рамках эксперимента по выявлению продолжительности инвазии часть мух после однократного заражения помещали в пластиковые трубки, переднее отверстие которых было закрыто сеткой с ячейей, размер которой позволял насекомому вытягивать хоботок и получать питание (15% сахарный сироп). Задняя часть трубки с мухой затыкалась куском ваты, которая не позволяла мухе перемещаться вдоль продольной оси трубки и впитывала фекалии насекомого. В трубках перемещение насекомых было ограничено, что исключало возможность автоинвазии через собственные фекалии мухи.

Для изучения механизмов передачи паразита и его гостальной специфичности мы проводили серию экспериментов по внутривидовой и межвидовой трансмиссии. Для этого к 5 незаражённым имаго подсаживали 1 заражённую муху того же вида, либо же 3 заражённых мух другого вида, и содержали в одном контейнере от 3 до 5 суток. Всех насекомых вскрывали и проверяли на наличие инфекции с помощью световой микроскопии. Каждая линия эксперимента включала несколько повторов.

## **Глава 3 Результаты и обсуждение**

### **3.1 Поисковые работы**

Работы по поиску симбионт-содержащих трипаносоматид среди представителей семейства Trypanosomatidae велись в двух основных направлениях: (1) поиск в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН с применением методов флюоресцентной

микроскопии и молекулярного штрихкодирования; (2) поиск среди природных заражений с применением аналогичных методов.

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

#### Результаты

Всего в ходе исследования коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН мы проанализировали 74 штамма трипаносоматид, которые хранятся в банке культур, и 46 гистологических мазков из коллекции архивных препаратов. При анализе лабораторных культур особое внимание уделялось представителям рода *Wallacemonas*. Тем не менее, ни анализ с применением флуоресцентной микроскопии, ни амплификация бактериального гена 16S рРНК не позволила выявить симбионт-содержащие виды среди проанализированных штаммов.

Анализ ультраструктуры жгутиконосцев рода *Wallacemonas* (4 штамма из коллекции банка культур ЗИН РАН: *W. ravinae*, *W. collosoma*, *W. rigidus* и штамм WSD) не показал присутствия симбионт-подобных структур, однако позволил выявить ряд морфологических особенностей, сближающих валласемонасов с симбионт-содержащими трипаносоматидами подсемейства Strigomonadinae. 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 (рисунок 1).

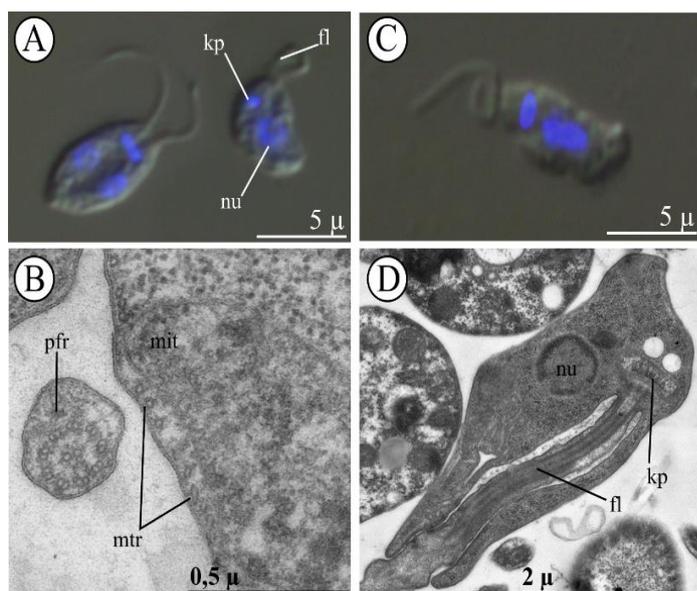


Рисунок 1. Морфология жгутиконосцев рода *Wallacemonas* в культуре. А – промастиготы штамма WSD (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); В – ультраструктура клеток штамма WSD (ТЭМ); С – промастигота *Wallacemonas collosoma* (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); D – ультраструктура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

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

Анализ 46 архивных препаратов трипаносоматид из коллекции ЗИН РАН, окрашенных по методу Гимза-Романовского, позволил выявить симбионт-подобные тела в клетках

трипаносоматид, ранее описанных как *Leptomonas repentinus* (Мальшева, Фролов, 2002). Клетки на мазках были представлены крупными, преимущественно двужгутиковыми промастиготами с крупным кинетопластом в передней части клетки. У небольшой части клеток (~10%) помимо ядра и кинетопласта мы отмечали крупную, интенсивно окрашенную структуру, которая занимала постнуклеарное положение (рисунок 2).

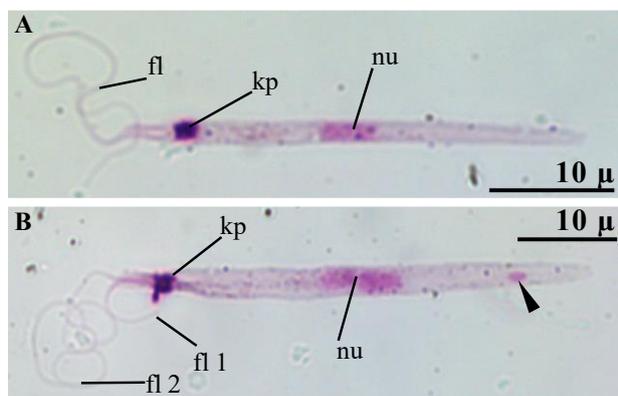


Рисунок 2. Промастиготы *Leptomonas repentinus* в культуре (мазки, окраска по Гимза-Романовскому). – промастигота *L. repentinus*; В – промастигота *L. repentinus* с симбионт-подобным телом.

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

### Обсуждение

Трипаносоматиды рода *Wallacemonas* на многих опубликованных филогенетических деревьях занимали сестринское положение по отношению к кладе, объединяющей симбионтсодержащих трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae. Кроме того, у одного из ранее описанных видов («*Leptomonas rigidus*») была описана септированная тубулемма – признак, считавшийся одной из основных синапоморфий симбионтсодержащих стригомонадин. В связи с этим штаммы, относящиеся к роду *Wallacemonas*, представлялись наиболее перспективными для поиска бактериальных цитобионтов.

В результате ультраструктурных исследований валласемонасов нам удалось выявить редуцированный парафлагеллярный тяж, относительно рыхлый кинетопласт, и нерегулярный субпелликулярный слой микротрубочек, в брещи которого заходят ветви разветвлённого митохондрия. Эти признаки в течение долгого времени считались характерными синапоморфиями подсемейства Strigomonadinae. Однако филогенетическое положение рода *Wallacemonas* на текущий момент представляется неясным: позиция этого рода очень варьирует в зависимости от выбора метода построения филогенетических деревьев, а также выбора генетических маркеров и генетических последовательностей, включённых в анализ. Кроме того, в последние годы проводились описания новых родов и видов, которые включались на филогенетические схемы и меняли их топологию. В результате род *Wallacemonas* может позиционироваться как сестринская ветвь по отношению к подсемейству Strigomonadinae, либо

же образует сестринскую ветвь по отношению к трипаносоматидам рода *Vickermania* или неидентифицированным природным сиквенсам.

Сейчас неясно, почему эти организмы, обладая явными синапоморфиями симбионтсодержащих трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae, не имеют цитоплазматических симбионтов. Мы предлагаем два альтернативных объяснения: (1) валласемонасы не являются эволюционно близкой ветвью подсемейства Strigomonadinae, симбионт-содержащие виды в этой группе отсутствуют, а разветвлённый митохондрион, нарушающий регулярность тубулеммы, а также редуцированный параксиальный тяж и рыхлый кинетоплат появляются в этой эволюционной линии независимо; (2) либо же род *Wallacemonas* и подсемейство Strigomonadinae – эволюционно близкие группы, тогда характерные морфологические признаки могли возникнуть у их общего предка в связи с появлением симбионта, которого жгутиконосцы рода *Wallacemonas* впоследствии утратили. Потеря симбионта в этом случае могла проходить в пределах всего рода, либо же среди его известных на сегодняшний день представителей, и тогда возможно предположение, что симбионт-содержащие виды в этой группе существуют, но на данный момент ещё не описаны. В любом случае, изучение данного вопроса требует дополнительных масштабных геномных исследований.

Исследование морфологии *Leptomonas repentinus* по архивным гистологическим мазкам и опубликованным микрофотографиям (Малышева, Фролов, 2002) позволяет нам сделать вывод о принадлежности этого жгутиконосца к роду *Vickermania*, для которого характерно наличие «двужгутиковых промастигот» и необычайно крупного и рыхлого кинетопласта. На сегодняшний день в составе рода *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 считать, что в пределах данного рода могут существовать как апосимбионтные виды, так и виды, вступающие в симбиотические ассоциации.

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

#### Результаты

Мы проанализировали 236 новых изолятов трипаносоматид, полученных из природных заражений насекомых в ходе полевых исследований 2016-2020 гг, с использованием фрагмента гена 18S рРНК. Результаты молекулярного штрихкодирования позволили нам выявить 2 изолята широко распространённого вида симбионт-содержащих трипаносоматид *Angomonas deanei*

(изоляты MN и Chr 51), и один новый вид, принадлежащий к этому же роду (изолят M29) (таблица 1).

Таблица 1. Симбионт-содержащие изоляты, полученные в ходе полевых работ 2016-2021 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> Chr51	<i>Protophormia terraenovae</i> (Diptera: Calliphoridae)	Село Усть-Хайрюзово, Камчатский край (57°07' с.ш., 156°64' в. д.)
<i>Angomonas sp.</i> M29-9	<i>Calliopum elisae</i> (Diptera: Lauhaniidae)	Дер. Ляды, Псковская обл. (58°35' с. ш., 28°55' в. д.)

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 ранее неопisanного фитомонад из клопа *Picromerus bidens*. Новый вид был описан нами как *Phytomonas borealis*.

#### Обсуждение

Нам удалось обнаружить 4 изолята симбионт-содержащих трипаносоматид на севере Евразии. Два из них принадлежат к широко распространённому симбионт-содержащему виду *A. deanei*, который ранее не был обнаружен на севере Евразии. Последовательность гена 18S рРНК изолята M29-9 оказалась уникальной среди последовательностей базы GenBank. Данный изолят принадлежит к новому виду в пределах рода *Angomonas*. Четвёртый изолят относится к виду *Phytomonas borealis*, который принадлежит к группе преимущественно диксенных паразитов высших растений. Более подробное обсуждение этих находок приводится в следующих разделах.

#### 3.1.3 *Angomonas deanei*

##### Результаты

Нам удалось получить 2 изолята, относящихся к виду *A. deanei*: изолят MN из кишечника мухи *Lucilia sp.* (Diptera: Calliphoridae) (Ленинградская обл.) и изолят Chr51 из кишечника мухи *Calliphora terraenovae* (Diptera: Calliphoridae) (Камчатский край). К сожалению, впоследствии культура второго изолята была утрачена, и дальнейшие исследования проводились на *A. deanei* MN.

В культуре клетки *A. deanei* MN представлены тремя основными морфотипами: промастиготами, парамастиготами и опистомастиготами. Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI позволило выявить бактериальных цитобионтов трёх типов: одиночные симбионты округлой формы (рисунок 3 А), симбионты гантелеобразной формы (рисунок 3 В), и парные симбионты (рисунок 3 С). Разнообразие морфотипов эндосимбионтов в данном случае отражает последовательные фазы их клеточного цикла.

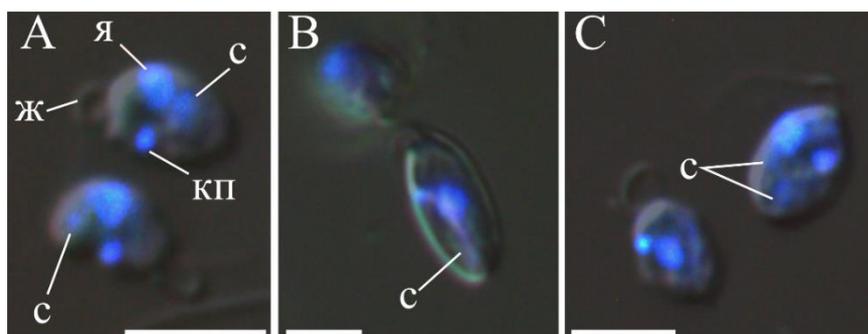


Рисунок 3. Совмещенное фото DIC- и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI) клеток *Angomonas deanei* MN в культуре. А – клетка с одним симбионтом в цитоплазме; В – клетка с делящимся гантелеобразным симбионтом; С – клетка с двумя симбионтами. Масштабная линейка – 10 мкм. кп – кинетоласт; с – эндосимбионт; я – ядро; ж – жгутик.

Ультратонкая организация клеток *A. deanei* MN является типичной для большинства изученных стигомонадин и соответствует ранним описаниям, за исключением цитостома в основании жгутикового кармана, речь о котором пойдёт далее.

### Обсуждение

Впервые *Angomonas deanei* был выделен из кишечника редувиидного клопа *Zelus leucogrammus* (Hemiptera, Reduviidae) в Бразилии и впоследствии он был обнаружен в мухах семейств Calliphoridae, Muscidae, Syrphidae и Sarcophagidae преимущественно в регионах экваториального, субэкваториального, тропического или субтропического поясов: Африке (Гана, Кения), Южной (Эквадор) и Центральной Америке, Европе (Болгария, Чехия, Турция), Центральной Азии (Монголия), Папуа-Новой Гвинее и Мадагаскаре. Наши исследования показывают, что *A. deanei*, по-видимому, так же встречается в северных регионах умеренного пояса и, возможно субарктическом поясе Евразии и, таким образом, в пределах рода является самым распространённым видом стигомонадин, ареал которого распространяется далеко за пределы тропических регионов.

3.1.4 *Angomonas* sp. M29-9

## Результаты

*Angomonas* sp. M29-9 был выделен из кишечника мухи *Calliopyum elisae* (Diptera: Lauxaniidae), пойманной в окрестностях дер. Ляды, Псковской области. Анализ последовательностей гена 18S рНК и бактериального гена 16S рНК трипаносоматид показал, что жгутиконосцы этой культуры относятся к новому виду в пределах рода *Angomonas*. Филогенетический анализ этих двух маркеров показал, что филогенетические позиции нового вида трипаносоматид и его симбионта являются конгруэнтными. *Angomonas* sp. M29-9 занимает промежуточную позицию между кластером изолятов, относящихся к *A. deanei*, и ветвью, которая разделяется на *A. desouzai* и *A. ambiguus* (рисунок 4). Уровень различий в генетических последовательностях по маркеру 18S рНК между видами *Angomonas* sp. M29-9/*A. deanei* и *Angomonas* sp. M29-9/*A. desouzai* составляет 2,3 и 2,4% соответственно.

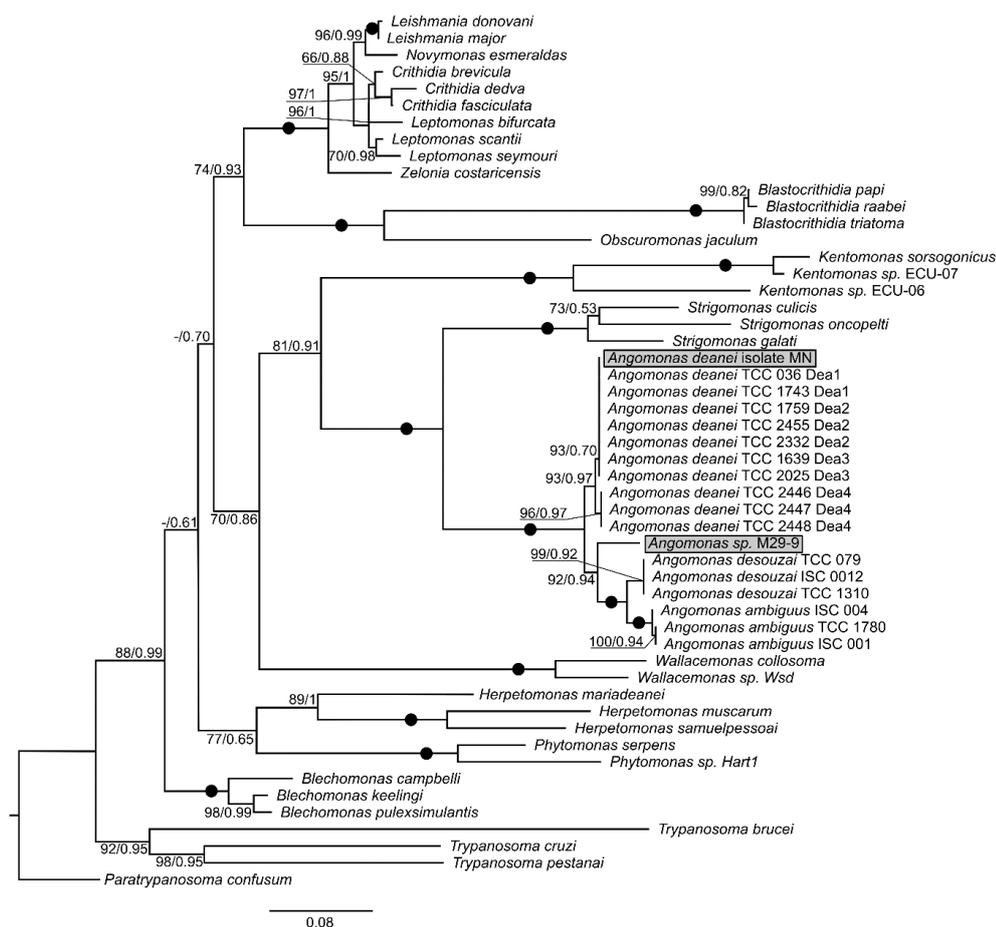


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рНК (построено с использованием модели TIM2e+I+G4). Значения в узлах соответствуют процентам бутстреп-поддержки и апостериорным вероятностям соответственно (узлы со значениями 100% и 1 указаны чёрными кругами). Значения менее 50% и 0.5 заменены прочерками. Масштабная линейка показывает количество замен на нуклеотид. Исследуемые изоляты выделены.

Филогенетическое дерево построено на основании 52 последовательностей. Длина итогового выравнивания составила 1803 нуклеотидов.

На филогенетическом дереве, построенном с использованием бактериального маркера 16S рРНК симбионт нового вида трипаносоматид позиционируется между видами *Ca. K. crithidii* (симбионты *A. deanei* и *A. ambiguus*) и *Ca. K. desouzaii* (симбионт *A. desouzai*) (рисунок 5). Уровень генетических различий в последовательностях гена 16S рРНК между *Ca. Kinetoplastibacterium sp.* M29-9 и *Ca. K. crithidii*/*Ca. K. desouzaii* составил 1,2% для обоих случаев.

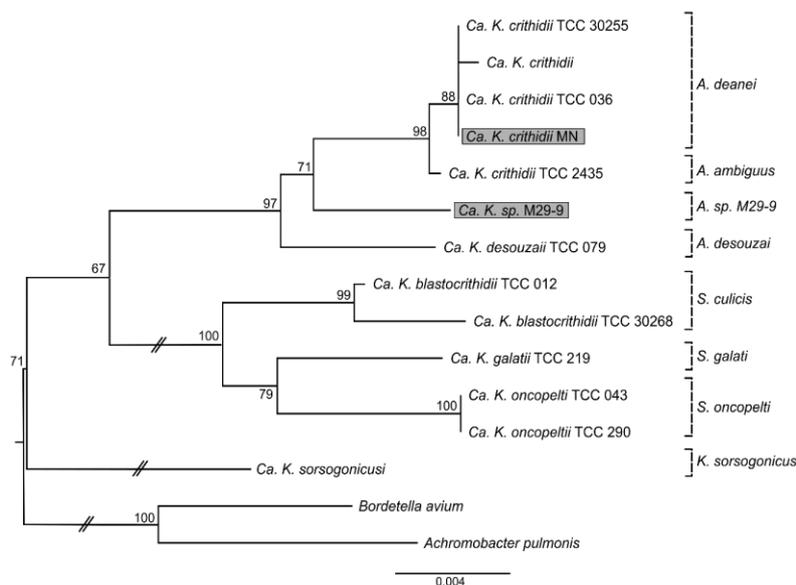


Рисунок 5. Филогенетическое дерево, реконструированное методом присоединения соседей по последовательностям бактериального гена 16S рРНК. Значения в узлах соответствуют значениям бутстреп-поддержки (50000 повторов). Исследуемые изоляты выделены. Масштабная линейка показывает количество замен на нуклеотид.

Филогенетическое дерево построено на основании 15 последовательностей. Длина итогового выравнивания составила 1417 нуклеотидов.

В культуре клетки изолята M29-9 представлены 3 основными морфотипами, характерными для представителей рода *Angomonas*: промастиготами, парамастиготами и опистомастиготами. Бактериальный симбионт хорошо выражен и располагается около заднего края ядра или за ним. Как и в случае с *A. deanei*, мы выделили три типа симбионтов в клетках жгутиконосца: одиночные округлые формы (рисунок 6 Б), симбионты гантелеобразной формы, находящиеся в процессе цитокинеза (рисунок 6 В), и парные симбионты после разделения (рисунок 6 А).

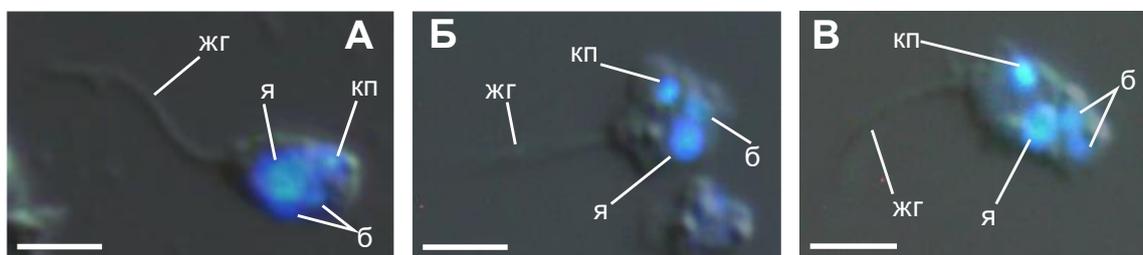


Рисунок 6. Морфология *Angomonas sp.* M29-9 в лабораторной культуре. Совмещенное фото DIC- и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI). Масштабная линейка 10 мкм. б – бактериальный симбионт, жг – жгутик, кп – кинетопласт, я – ядро

## Обсуждение

Новый вид *Angomonas sp.* M29-9 был обнаружен в кишечнике мухи *Calliopus elisae* (Diptera: Lauxaniidae) на северо-западе России. Сравнение последовательностей генов 18S рРНК жгутиконосца и 16S рРНК его симбионта с последовательностями ранее описанных видов показывает, что уровень генетических различий между ними соответствует межвидовому. По всей видимости, дивергенция *Angomonas sp.* M29-9 и его симбионта от общей ветви происходила параллельно процессам видообразования других видов. Род *Angomonas* чрезвычайно широко распространён в регионах Неотропической, Афротропической, Палеарктической, Индо-Малайской зон, а также Австралии, и потому считается, что возникновение и последующая эволюция трипаносоматид рода *Angomonas* связана с тропическими регионами – Афротропиками или Неотропиками, а всесветное распространение – следствие последующего активного расселения. Однако в ходе многочисленных масштабных исследований паразитофауны двукрылых в тропических регионах изоляты, последовательности которых были бы идентичны *Angomonas sp.* M29-9, ранее не были выявлены. Регион происхождения рода *Angomonas* на сегодняшний день до конца не определён, однако мы можем утверждать, что если не происхождение, то по крайней мере эволюционная история нового вида связана с регионами Палеарктики.

3.1.5 *Phytomonas borealis*: первый симбионт-содержащий представитель подсемейства

Phytomonadinae

Результаты

В ходе исследования паразитарных инфекций в кишечнике имаго клопов *Picromerus bidens*, собранных в двух регионах (Псковская область, окрестности дер. Ляды, и Новгородская область, окрестности дер. Оксочи), были обнаружены жгутиконосцы. Клетки паразитов были представлены длинными червеобразными промастиготами, занимавшими среднюю кишку насекомого. Сравнение последовательности гена 18S рРНК с последовательностями базы GenBank показало её уникальность: ближайшим попаданием BLAST был *Phytomonas nordicus* – 8 различий в последовательностях нуклеотидов на фрагмент длиной 1781 нуклеотидов, что указывает на принадлежность этих трипаносоматид к разным видам. Анализ максимального правдоподобия и байесовский филогенетический анализ, основанные на гене 18S рРНК, подтвердили тесную связь этих двух видов с высокой достоверностью (рисунок. 7). Новый вид был назван *P. borealis*.

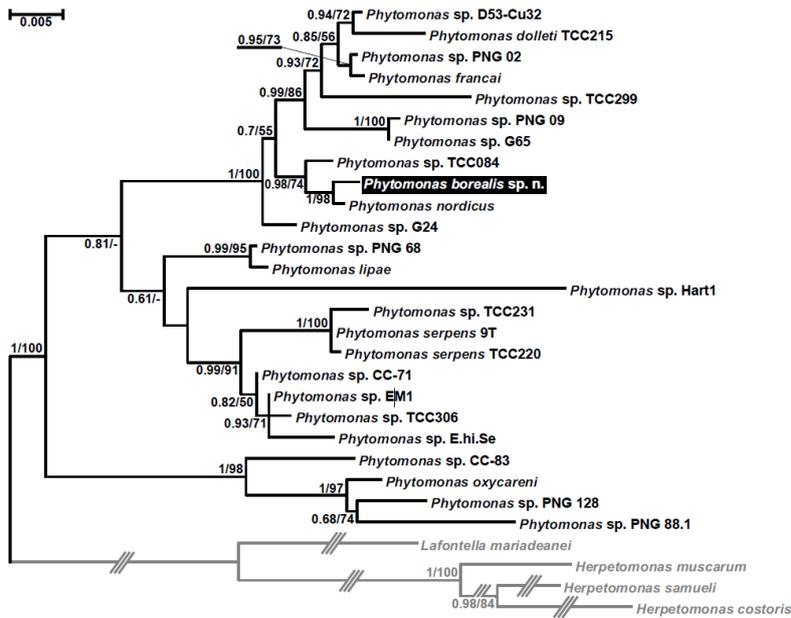


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены прочерками. Ветви с тройным перечёркиванием сокращены на 1/3 от их первоначальной длины. Масштабная линейка показывает количество замен на нуклеотид. Исследуемый вид *Phytomonas borealis* выделен.

Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI выявило множество небольших (около 20) ДНК-содержащих бактериоподобных телец, расположенных преимущественно в постнуклеарной части клетки (рисунок 8). Эти тела были обнаружены только у трипаносоматид из Новгородской области (рисунок 8 А), в то время как у жгутиконосцев из второй локации эти структуры не наблюдались (рисунок 8 В). Как правило, такие бактериоподобные тела имели шаровидную, либо реже палочковидную форму. Анализ электронограмм показал, что эти структуры окружены двойным слоем мембран. Внешняя из двух мембран, окружающих их, по-видимому, является мембраной хозяина-жгутиконосца, судя по ее контактам с эндоплазматическим ретикулумом (рисунок 8 С, D). В бактериальных клетках не обнаружено ни периплазматического пространства, ни клеточной стенки.

### Обсуждение

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 и регуляция численности симбионтов со стороны жгутиконосца до конца не установлены. Отсутствие бактерий в цитоплазме жгутиконосцев Псковской области указывает на возможность того, что эта эндосимбиотическая система не является облигатной для жгутиконосцев. Неясно, теряла ли свободная от бактерий популяция *P. borealis* эндосимбионтов, или никогда их не было. К сожалению, нам не удалось получить культуру этих жгутиконосцев, поэтому на данный момент нельзя однозначно ответить

на этот вопрос. Тем не менее, нет сомнений в том, что эта эндосимбиотическая система возникла независимо от ранее изученных.

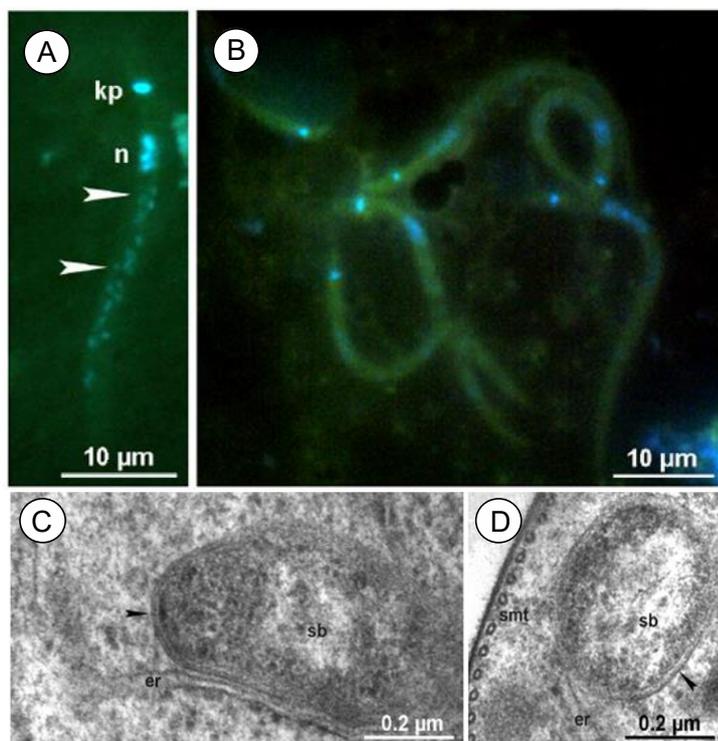


Рисунок 8. Промастиготы *Phytomonas borealis* из клопа *Picromerus bidens* (флуоресцентная и трансмиссионная микроскопия). А-В – окрашивание DAPI, С-Д – ультраструктура бактериальных симбионтов в клетках *Phytomonas borealis*.

er – эндоплазматическая сеть; kp – кинетопласт; n – ядро; sb – прокариотический симбионт; smt – субпелликулярные микротрубочки; белыми стрелками показаны прокариотические симбионты, черными стрелками показана мембрана симбионтофорной вакуоли.

### 3.2 Жизненные циклы симбионт-содержащих трипаносоматид

#### Результаты

В ходе выполнения поставленных в работе целей по исследованию жизненных циклов симбионтсодержащих трипаносоматид мы провели серию экспериментальных заражений насекомых. В качестве экспериментальных объектов были выбраны мухи нескольких видов семейства Calliphoridae, которые нетребовательны к условиям содержания, обладают непродолжительным временем генерации, а также характеризуются широкими ареалами. В качестве паразитов были выбраны *Novyomonas esmeraldas* и *Angomonas deanei*, которые являются представителями двух основных, хорошо охарактеризованных ветвей симбионтсодержащих трипаносоматид.

Серия экспериментов по заражению двух видов мух – *Protophormia terrestris* и *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) – паразитическим жгутиконосцем *Novyomonas esmeraldas* не была результативной, и нам не удалось получить стабильную инфекцию ни в одном из видов хозяев. Вскрытие имаго через 24 часа с момента заражения (10 *P. terrestris* и 10 *C. vicina*) позволило выявить только мёртвые клетки в средней кишке насекомого. Все особи, вскрытые через 6 дней с момента заражения (20 *P. terrestris* и 20 *C. vicina*), оказались незаражёнными.

Серия экспериментальных заражений по изучению жизненного цикла *A. deanei* оказалась более успешной. Мы проводили исследование развития инфекции этого жгутиконосца в личинках и имаго двух видов мух – *L. sericata* и *C. vicina*.

Клетки *A. deanei* проходят кишечник личинок транзитом вслед за пищевым комком. В случае экспериментов с однократным заражением однодневных личинок мы отмечали распространение жгутиконосцев по всей длине кишечника в течение двух часов с момента заражения. В течение двух последующих суток отдельные клетки паразита, не образующие каких-либо агрегаций, встречались в средней и задней кишке личинки, однако вскрытия на 3 и 5 сутки с начала инфекции не выявили присутствия трипаносоматид.

В ходе второй линии экспериментов, когда личинки непрерывно содержались на заражённом субстрате, инфекция была отмечена вплоть до 3-5 дня. Однако 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. Оценка количества вылупившихся имаго из личинок, участвовавших в эксперименте, а также продолжительности стадии куколки, не показало значимых отличий от контрольной группы. Вылетевшие имаго из экспериментальной группы также не были заражены.

При инфекции имаго жгутиконосцы быстро распространяются по кишечнику насекомого: через 1 час с момента заражения жгутиконосцы оккупировали весь пищеварительный тракт, включая отделы задней кишки, однако через 4 часа мы не наблюдали клеток *A. deanei* в передней кишке насекомого. Спустя сутки с момента заражения и на протяжении всего дальнейшего эксперимента (до 37 суток у *L. sericata* и 17 суток у *C. vicina* при однократном заражении в условиях изоляции и иммобилизации) мы наблюдали жгутиконосцев исключительно в ректуме насекомых.

Эксперименты по передаче инфекции между имаго были успешными: нам удалось показать как внутривидовую трансмиссию (37,1% заразившихся *L. sericata* и 64,7% заразившихся *C. vicina*), так и межвидовую трансмиссию в серии перекрёстных заражений (таблица 2).

Таблица 2. Кросс-инфекции между *Calliphora vicina* и *Lucilia sericata* и *Lucilia sericata* и *Protophormia terraenovae*

Вид-донор	Вид-акцептор	
	<i>C. vicina</i>	<i>L. sericata</i>
<i>C. vicina</i>		N=30/Заражено 19 (63,3%)
<i>L. sericata</i>	N=30/ Заражено 21 (70%)	
	<i>L. sericata</i>	<i>P. terraenovae</i>
<i>L. sericata</i>		N=15/ Заражено 7 (46,7%)
<i>P. terraenovae</i>	N=15/ Заражено 9 (60%)	

В ректуме насекомого клетки *A. deanei* распределены неравномерно: наибольшие скопления прикрепленных клеток располагаются на поверхности ректальных желёз. Часть клеток прикрепляется к кутикуле ректального эпителия. Свободные жгутиконосцы в массе плавают в просвете ректума и прямой кишки (рисунок 9 А). Прикрепление к кутикулярной выстилке осуществляется посредством кончиков жгутиков или их латеральной поверхностью, структура кутикулы в месте прикрепления паразита остаётся неизменной (рисунок 9 В). Нам удалось выявить 3 морфотипа, описанных ранее в культуре *A. deanei*: промастиготы, опистомастиготы, и парамастиготы.

В целом ультратонкая организация клеток *A. deanei* в кишечнике хозяина не отличается от таковой для клеток в культуре. Примечательным является обнаружение у этих трипаносоматид цитостома в передней части жгутикового кармана, представленного небольшой цитостомальной ямкой, которая окружена плотным пероральным валиком. На дне цитостомальной ямки образуются небольшие везикулы. Рядом с цитостомом и сопряжённой с ним системой везикул располагаются микротрубочки (рисунок 9 С, D).

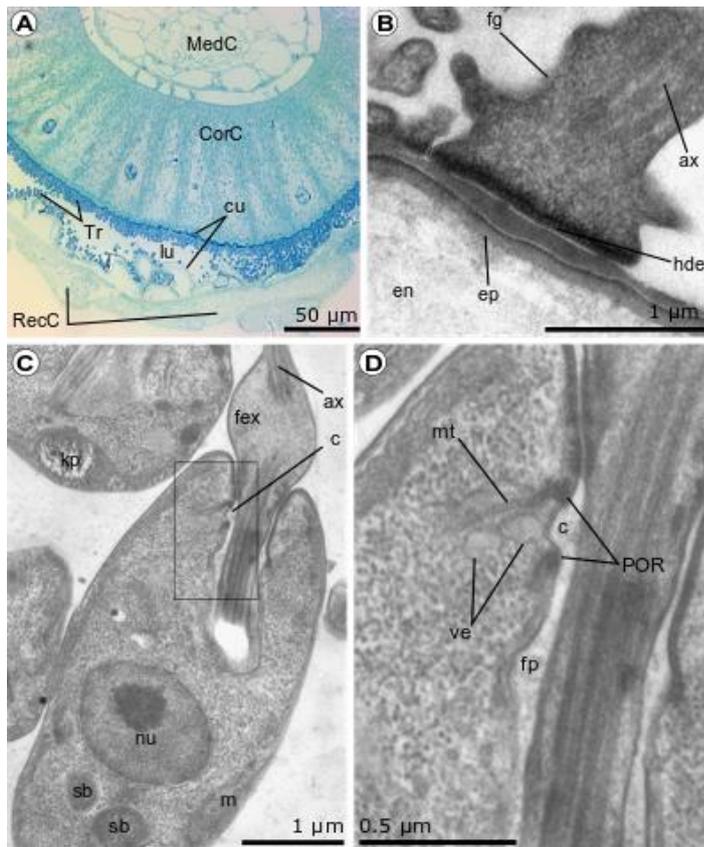


Рисунок 9. А – фрагмент поперечного полутонкого среза инфицированного ректума в области ректальной железы (окраска метиленовым синим). В-D – ультраструктура *A. deanei* в ректуме *L. sericata* (ТЭМ): В – прикрепление кончика жгутика трипаносоматид к эпикутикуле; С – поперечный срез в области кармана жгутика и цитостома; D – цитостом *A. deanei* (увеличенный сегмент С).

ax – аксонема; c – цитостом; CorC – клетки кортикального эпителия ректальной железы; cu – кутикула ректума; en – эндокутикула; ep – эпикутикула; fex – расширенная часть жгутика; fg – жгутик; fp – жгутиковый карман; hde – десмосомоподобные контакты; lu – просвет прямой кишки; MedC – медулярные клетки; m – митохондрия; mt – микротрубочки; nu – ядро; POR – преоральный валик; RecC – клетки ректального эпителия; sb – бактериальный симбионт; Tr – трипаносоматиды; ve – везикулы.

### Обсуждение

Из двух выбранных нами видов симбионтсодержащих трипаносоматид – *A. deanei* и *N. esmeraldas*, только первый образовывал стабильную инфекцию в мухах семейства Calliphoridae.

Считается, что симбионты путём выработки метаболитов способны повышать метаболический потенциал трипаносоматид и способствовать расширению круга их хозяев, однако нам не удалось экспериментально показать развитие *N. esmeraldas* в диптерных хозяевах. Изначально *N. esmeraldas* был выделен из кишечника клопа *Niesthrea vincentii* (изолят, с которым мы работали), но позднее также был обнаружен в кишечнике клопов *Chaetodus rutilans* и *Lasiomiris albopilosus* (Hemiptera, Miridae) в Папуа Новая Гвинея, и в мухе цеце *Glossina fuscipes* в Центральноафриканской Республике. Косвенно эти данные указывают на потенциально широкий круг хозяев *N. esmeraldas*, однако наши попытки заразить мух оказались неудачными. Вероятно, *N. esmeraldas* является видом с узкой гостальной специфичностью, а его обнаружение в широком круге различных хозяев – следствие неспецифических и, вероятно, кратковременных инвазий.

Напротив, нам удалось подтвердить ранее предполагавшуюся широкую специфичность *A. deanei*. Однако вопрос об исходном хозяине *A. deanei* остаётся открытым. Известно, что клопы *Z. leucogrammus*, из которых культура *A. deanei* была изолирована впервые, питаются в основном двукрылыми насекомыми из семейств Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae, и могут заражаться

трипаносоматидами из двукрылых в процессе поедания своих жертв. 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* в северных регионах России также говорит в пользу этого предположения.

Мы экспериментально показали, что *A. deanei* способен реализовывать свой жизненный цикл в ректуме взрослых мух, с предпочтительной локализацией жгутиконосцев на поверхности ректальных желёз насекомого. Ректальные железы являются полифункциональным, но не очень хорошо исследованным органом. Известно, что у насекомых они играют важную роль в реабсорбции воды и солей, всасывания остаточных аминокислот и в выделении половых феромонов.

Нами показано, что кишечник личинок мух клетки *A. deanei* проходят транзитом, не формируя стабильной инфекции и не оказывая влияния на последующее развитие насекомого. Между тем, в литературе известны случаи успешного заражения личинок брахицер и трансфазной передачи инфекции, несмотря на комплексные метаболические перестройки хозяина: *Jaenimonas drosophilae* образует крупные скопления в средней кишке личинок *Drosophila falleni* и сохраняется во время метаморфоза в жёлтом теле – скоплении клеток личиночной кишки (Hamilton et al., 2015), а двужгутиковая трипаносоматида, описанная как *Herpetomonas muscarum*, способна оккупировать среднюю кишку личинок *Hipellates pusio*, пенетрировать стенку кишки и проникать в гемоцель хозяина. Часть таких личинок с заражением в гемоцели 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, 1972 a, b).

Мы предполагаем, что неспособность *A. deanei* развиваться в кишечнике личинок мух может быть связана либо с действием антимикробных пептидов или иммунных механизмов насекомых, которые могут подавлять развитие инфекции, либо с особенностями строения задней кишки личинок, которая представляет собой вытянутую трубку, не имеет выраженного расширения и лишена ректальных желёз. 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.

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. Однако важной находкой является обнаружение цитостомальной ямки, сопряжённой с системой везикул. Данный комплекс можно

охарактеризовать как редуцированный цитостом-цитофарингиальный комплекс. Вероятно, эта структура у *A. deanei* принимает активное участие во внутриклеточном транспорте, и, возможно, фаготрофном питании. Ранее комплекс цитостом-цитофарингиальных органелл не был обнаружен при детальном ультраструктурном анализе стригомонадин, и его существование ставилось под сомнение. Возможно, 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.

### Заключение

В ходе выполнения настоящей работы нам удалось выявить и описать новые виды симбионт-содержащих трипаносоматид, а также расширить представления об ареале и гостальной специфичности симбионт-содержащих видов рода *Angomonas*.

Методы визуализации ДНК-содержащих органелл эффективны для обнаружения цитобионтов в клетках жгутиконосцев. Однако достоверная идентификация симбионтов возможна только с применением молекулярных методов, что возможно исключительно при наличии аксеничной культуры трипаносоматид. Огромный пул трипаносоматид из разных родов характеризуется крайней требовательностью к составу питательных сред и биофизическим условиям среды. К сожалению, такие виды не размножаются в лабораторных культурах. Эти трипаносоматиды относятся к так называемым «некультивируемым» видам, и известны главным образом по сиквенсам, полученным из природных заражений. Таким образом, в условиях отсутствия лабораторных культур и подробных морфологических описаний из природных заражений, значительная часть симбионт-содержащих «некультивируемых» видов трипаносоматид может выпадать из поля зрения исследователей. В настоящей работе нам удалось выявить две симбиотические ассоциации среди сложнокультивируемых видов, и дальнейшие шаги в изучении биологии этих симбионт-содержащих трипаносоматид должны быть связаны с выделением их в лабораторные культуры. Только этот шаг сможет помочь решить проблемы, связанные с биологией этих паразитов, и позволить идентифицировать цитобионтов новых изолятов.

Много лет исследования биоразнообразия трипаносоматид велись преимущественно в регионах тропической и экваториальной зон, откуда описана большая часть современных видов трипаносоматид. Результатом этих исследований стало ошибочное представление о низком биологическом разнообразии трипаносоматид в высоких широтах. Нам удалось обнаружить 4 вида симбионт-содержащих трипаносоматид среди материалов (как культур и архивных гистологических мазков, так и природных заражений), собранных в последние годы на севере России. Из них 2 вида относятся к родам *Phytomonas* и *Vickermania*, среди которых ранее не

отмечались симбионт-содержащие виды. Очевидно, видовое богатство трипаносоматид севера умеренной зоны Евразии значительно шире, чем представлялось ранее. Таким образом, мы полагаем, что дальнейший поиск симбионт-содержащих видов на северных территориях Евразии принесёт немало открытий.

Нам удалось описать жизненный цикл одного из наиболее распространённых симбионт-содержащих видов трипаносоматид – *A. deanei*, и экспериментально подтвердить его широкую гостальную специфичность среди имаго брахицер. Одной из интереснейших особенностей этого паразита является наличие редуцированного цитостом-цитофарингеального комплекса, который ранее не был отмечен ни для одного из видов в пределах подсемейства Strigomonadinae. Данная находка может иметь крайне важное значение для понимания происхождения симбиотических отношений в данной группе.

### **Выводы**

1) Исследованные нами 4 штамма, относящиеся к роду *Wallacemonas* (*W. ravinae*, *W. collosoma*, *W. rigidus* и штамм WSD) не имеют бактериальных эндосимбионтов. Комплекс морфологических особенностей, встречающийся у видов рода *Wallacemonas* и симбионтсодержащих трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae (нерегулярная/септированная тубулемма, прерываемая ветвями митохондрия, редуцированный парафлагеллярный тяж и относительно рыхлый кинетопласт), появляются в этих группах независимо, либо являются следствием древней потери симбионтов среди паразитов рода *Wallacemonas*.

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 родов *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 рода *Angomonas*, описанных ранее в тропических и экваториальных регионах, распространяется на северные широты умеренного пояса Евразии.

5) Процессы диверсификации (и возможного видообразования) трипаносоматид рода *Angomonas* не ограничены территориями Афро- и Неотропиков, но также происходят на территории Евразии.

6) Широкая распространённость и отсутствие строгой гостальной специфичности *A. deanei* (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 диссертации

#### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Ганюкова, А. И.** *Angomonas deanei* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) из мухи *Lucilia sp.* (Diptera: Calliphoridae): описание и культивирование нового штамма / А. И. Ганюкова, М. Н. Мальшева, А. О. Фролов // Паразитология. – 2017. – Т. 51. – С. 5.
2. **Ganyukova, A. I.** Life cycle, ultrastructure and host-parasite relationships of *Angomonas deanei* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) / A. I. Ganyukova, M. N. Malysheva, A. O. Frolov // Protistology. – 2020a. – Т. 14. – №. 4. – С. 204–218.
3. **Ganyukova, A. I.** A novel endosymbiont-containing trypanosomatid *Phytomonas borealis* sp. n. from the predatory bug *Picromerus bidens* (Heteroptera: Pentatomidae) / A. I. Ganyukova, A. O. Frolov, M. N. Malysheva, V. V. Spodareva, V. Yurchenko, A. Y. Kostygov // Folia Parasitologica. – 2020b. – Т. 67. – С. 1–8.
4. Kostygov, A. Y. et al. *Vickermania* gen. nov., trypanosomatids that use two joined flagella to resist midgut peristaltic flow within the fly host / A. Y. Kostygov, A.O. Frolov, M.N. Malysheva, **A. I. Ganyukova**, L. V. Chistyakova, D. Tashyreva, M. Tesařová, V. Spodareva, J. Režnarová, D. Macedo, A. Butenko, C. d'Avila-Levy, J. Lukeš, V. Yurchenko // BMC biology. – 2020. – Т. 18. – №. 1. – С. 1–16.
5. **Ganyukova, A. I.** Experimental infection of the fly *Calliphora vicina* with the trypanosomatid *Angomonas deanei* and cross-infection between different calliphorid species / A. I. Ganyukova, M. N. Malysheva, A. O. Frolov // Protistology. – 2021. – Т. 15. – №. 2. – С. 88–95.

#### Публикации в сборниках и материалах конференций:

1. **Ганюкова, А. И.** Особенности географического распространения моноксенных трипаносоматид *Angomonas deanei* в северных регионах Евразии / А. И. Ганюкова, А. В. Золотарёв // Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Материалы VI Съезда Паразитологического общества. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 94

2. **Ganyukova, A.** *Angomonas deanei* (Trypanosomatidae) life cycle in intestines of two fly species: *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* (Brachycera, Calliphoridae) / A. Ganyukova, M. Malysheva, A. Zolotarev, A. Kostygov, A. Frolov // 49<sup>th</sup> Jírovec's Protozoological Days Conference Proceedings. – Czech Republic, Prague, 2019. – P. 21
3. Zolotarev, A. Trypanosomatids diversity in Northern Eurasia: who lives in taiga and tundra? / A. Zolotarev, M. Malysheva, A. Kostygov, A. Frolov, **A. Ganyukova** // 49<sup>th</sup> Jírovec's Protozoological Days Conference Proceedings. – Czech Republic, Prague, 2019. – P. 21
4. Kostygov, A. Y. Peculiar trypanosomatid lineage with biflagellated cells / A. Kostygov, A. Frolov, M. Malysheva, **A. Ganyukova**, V. Spodareva, D. Macedo, J. Králová, J. Lukeš, D. Tashyrevac, V. Yurchenko // Abstract book of the VIII European Congress of Protistology (ECOP) Italy, Rome, 2019.