

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Ганюкова Анна Игоревна

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

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
Фролов Александр Олегович

Санкт-Петербург

2022

Оглавление

Введение	4
Глава 1 Обзор литературных данных	11
1.1 Общая характеристика семейства Трипаносоматиде	11
1.2 История изучения семейства Трипаносоматиде	12
1.3 История изучения симбионтсодержащих трипаносоматид	18
1.4 Подсемейство Strigomonadinae Votýpka, Yurchenko, Kostygov et Lukeš, 2014.....	23
1.5 Род <i>Novumonas</i> Kostygov et Yurchenko 2015	27
1.6 Происхождение и филогения бактериальных симбионтов трипаносоматид	28
1.7 Особенности геномов бактериальных симбионтов трипаносоматид.....	29
1.8 Особенности морфологии симбионтсодержащих трипаносоматид	32
1.9 Метаболическая кооперация трипаносоматид и бактериальных симбионтов	33
1.10 Регуляция численности эндосимбионтов.....	36
1.11 Влияние эндосимбионтов на клетки жгутиконосцев.....	37
1.12 Горизонтальный перенос генов	38
Глава 2 Материалы и методы	43
2.1 Сбор и вскрытие насекомых.....	43
2.2 Культивирование трипаносоматид.....	44
2.3 Клонирование трипаносоматид	44
2.4 Световая микроскопия	44
2.5 Флюоресцентная микроскопия	45
2.6 Электронная микроскопия.....	45
2.7 Выделение геномной ДНК, ПЦР, очистка фрагментов из ПЦР-смеси и секвенирование	46
2.8 Филогенетический анализ	46
2.9 Экспериментальные заражения	47
Глава 3 Результаты и обсуждение	49
3.1 Поисковые работы.....	49
3.1.1 Поиск новых симбионт-содержащих видов в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН	49
3.1.2 Поиск симбионт-содержащих изолятов трипаносоматид в природных популяциях хозяев на севере России	53
3.1.3 <i>Angomonas deanei</i>	55
3.1.4 <i>Angomonas</i> sp. M29-9.....	62
3.1.5 <i>Phytomonas borealis</i> : первый симбионт-содержащий представитель подсемейство Phytomonadinae	65
3.2 Жизненные циклы симбионт-содержащих трипаносоматид	73
3.2.1 <i>Novumonas esmeraldas</i>	73
3.2.2 <i>Angomonas deanei</i> : морфология и жизненный цикл	74

Заключение	89
Выводы	91
Список литературы	94
Приложение. Номера использованных последовательностей из базы GenBank	111

Введение

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 трансформации 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 плотные 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

вливают на способность жгутиконосца 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 распространения, жизненными циклами и способами распространения, а также влиянием симбиоза с прокариотными организмами на эволюцию семества *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 флюоресцентной 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 и оценки роли таких ассоциаций в эволюции семейства Trypanosomatidae.

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 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 «асимметричного» 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 – 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 семейства *Trypanosomatidae*.

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.

Так же были опубликованы 4 тезиса конференций. Результаты работы представлены и обсуждены на 1 всероссийской конференции с международным участием и 2 международных конференциях. Результаты исследования были представлены на всероссийской конференции с международным участием «Современная паразитология — основные тренды и вызовы» (Санкт-Петербург, 2018), международной конференции «49th Jírovec's Protozoological Days» (Чехия, Костелец над Черными лесами, 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, мне бы хотелось 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 кафедры 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.

Глава 1 Обзор литературных данных

1.1 Общая характеристика семейства Trypanosomatidae

Жгутиконосцы семейства Trypanosomatidae (Kent 1880, emend. Vickerman, 1976) представлены облигатными паразитами беспозвоночных, позвоночных животных, высших растений и даже некоторых протистов (Frolov et al., 2021). На современной филогенетической схеме эукариот трипаносоматиды – единственное семейство в пределах отряда Trypanosomatida (Kent, 1880 stat. nov. Hollande, 1952), который входит в состав класса Kinetoplastea (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976). Кинетопластиды вкупе с эвгленовыми жгутиконосцами формируют монофилетический таксон Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981, emend. Simpson 1997), входящий в супергруппу Excavata (Cavalier-Smith 2002, emend. Simpson 2003) (Roger, Simpson, 2009). Уникальной особенностью кинетопластид является наличие в клетках кинетопласта – органеллы, представляющей собой специализированный субкомпаратмент единого митохондрия клетки, в котором локализована митохондриальная ДНК, организованная в десятки макси- и тысячи миникольцевых молекул (Vickerman, Preston, 1976; Frolov, Karpov, 1995; Lukeš et al., 2002).

Кинетопластиды объединяют как свободноживущих, так и паразитических протистов, однако филогенетические исследования демонстрируют, что переход к паразитизму происходил в пределах группы независимо и многократно в различных отрядах таксона (Moreira et al. 2004; Simpson et al. 2006; Lukes et al. 2014). Следствием одного из таких переходов стало обособление группы облигатных паразитов семейства Trypanosomatidae (Simpson et al. 2004; Flegontov et al. 2013; Lukeš et al. 2014).

Представители семейства Trypanosomatidae обладают комплексом уникальных морфологических особенностей. Покровы трипаносоматид представлены тубулеммой, которая состоит из плазматической мембраны и подстилающих ее продольных микротрубочек (Фролов, 2000). Как правило, тубулемма большинства трипаносоматид (за некоторыми исключениями) на поперечных срезах составляет замкнутое кольцо микротрубочек (Frolov, Karpov, 1995). Локомоторный аппарат представлен одним направленным вперёд жгутиком, который может быть свободным, либо прикреплённым к мембране клетки. В последнем случае между поверхностью жгутика и клеточной мембраной формируются десмосомо-подобные контакты. Подобная структура получила название ундулирующей мембраны (рис. 1.1) (Фролов, 2000). Вдоль аксонемы жгутика большинства трипаносоматид располагается парафлагеллярный (параксиальный) тяж, состоящий из комплекса микрофибрилл (Frolov, Karpov 1995). Жгутик является полифункциональной органеллой, которая может использоваться как для локомоции,

так и для прикрепления к поверхности тканей хозяина или проникновения через них (Frolov, Karpov, 1995; Kostygov et al., 2016; Frolov et al., 2020). Жгутик залегает в особом углублении плазмалеммы – жгутиковом кармане, который может быть очень глубоким и достигать задней части клетки (Frolov, Karpov, 1995).

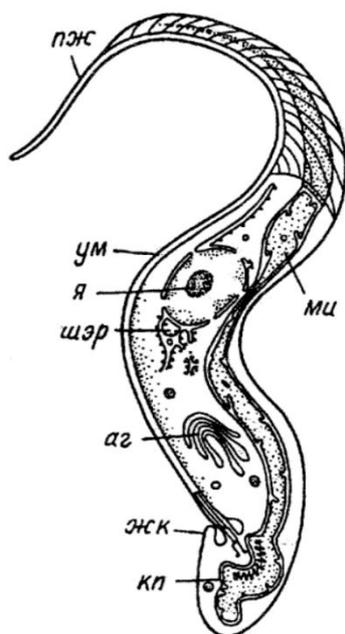


Рисунок 1.1. Схема ультраструктуры клетки *Trypanosoma vivax* (по: Vickerman 1966, с изменениями).

аг – аппарат Гольджи, жк – жгутиковый карман, кп – кинетопласт, ми – митохондрия, пж – передний жгутик, ум – ундулирующая мембрана, шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, я – ядро.

Кинетопласт как правило локализован рядом с кинетосомой жгутика. Он представляет собой дисковидное выпячивание стенки митохондрии (капсула кинетопласта), внутри которого находится плотно упакованная сеть из нескольких сотен максикольцевых (длиной 20—38 тысяч пар нуклеотидов) и нескольких десятков тысяч миникольцевых (0,4—2,5 т.п.н.) молекул ДНК (нуклеоид) (Vickerman, Preston, 1976).

Ряд видов характеризуется наличием цитостом-цитофарингиального комплекса, разнообразие вариантов строения которого варьирует от полностью развитых всех его элементов (паразиты рыб, трипаносомы подрода *Schizotrypanum* и *Herpetomonas nabiculae*), до абсолютного отсутствия каких-либо его следов (роды *Blastocrithidia*, *Phytomonas*, *Leishmania*) (Frolov, Karpov, 1995).

1.2 История изучения семейства Trypanosomatidae

Заболевания, вызываемые трипаносоматидами, известны с древних времён. Первые описания симптомов, сходных с проявлениями кожного лейшманиоза Старого Света, встречаются на таких исторических документах, как таблички библиотеки царя Ашшурбанипала (датируются VII в. до н. э.) и древнеегипетском медицинском трактате «Папирус Эберса» (датируется 1500 г. до н.э.). В регионах Нового Света так же находятся

ранние свидетельства описаний трипаносомозов: последствия кожного и слизисто-кожного лейшманиозов, которые проявляются как характерные обезображивающие деформации, были идентифицированы в скульптурах с 5-го века и в трудах испанских миссионеров 16-го века (Сох, 2002).

Считается, что трипаносоматиды были впервые обнаружены и описаны Антони ван Левенгуком около 1680 г (Dobell, 1932). Работая над описанием сперматозоидов насекомых («семенных анималькул»), в одном из слепней он обнаружил жгутиконосцев: «Я также видел летом в большом слепне (который оказался самкой со множеством яиц) множество мелких анималькул; хотя они были менее шестой части длины [сперматозоидов] вышеупомянутых животных, но в десять раз толще. Они лежали, перемешанные с содержимым кишечника мухи, и двигались очень быстро» (цит. по: Dobell, 1932). Несмотря на скудное описание, размеры и локализация «анималькул» оставляют мало сомнений в том, что Левенгук описывал именно трипаносоматид (Dobell, 1932).

Началом целенаправленного и интенсивного изучения группы можно считать середину XIX века. В 1843 г. вышли две значимые работы. Карлус Мауэр опубликовал описание кровепаразитов бесхвостых амфибий, которые получили название *Amoeba rotatoria*. Спустя несколько месяцев вышло описание гемофлагеллят лягушки, в котором они были отнесены к новому роду *Trypanosoma* и получили название *T. sanguinus*. Поскольку строение обоих видов паразитов было сходным, в дальнейшем *A. rotatoria* был перемещён в род *Trypanosoma* и определён как типовой вид *T. rotatorium* (Mayer, 1843) Gruby, 1843 (цит. по: Hoare, 1964).

Первое описание моноксенных трипаносоматид датируется 1856 г., когда Джозеф Лейди описал паразита, изначально названного *Bodo muscarum* (и позднее переименованного в *Herpetomonas muscarum*), из кишечника домашней мухи (Leidy, 1856: цит. по: Wallace, 1996). Позднее, в 1880 г., были учреждены ещё два новых рода моноксенных трипаносоматид: *Herpetomonas*, в состав которого входил типовой вид *H. muscae-domesticae*, и *Leptomonas*, включивший типовой вид *Leptomonas buetchlii* (Kent, 1880). В системе, предложенной Кентом, эти два рода были включены в состав разнородного семейства Monadidae (отряд Flagellata-Pantostomata), а род *Trypanosoma* был выделен в отдельный отряд Trypanosomata на основании наличия ундулирующей мембраны.

Повышенный интерес к трипаносоматидам возник на рубеже XIX – начала XX вв. В этот период были описаны *T. evansi*, *T. brucei* и *T. equiperdum* – возбудители заболеваний человека и животных. Был выделен новый род *Leishmania* Ross 1903, включивший в себя возбудителей кожного и висцерального лейшманиозов Старого Света. Появился ряд работ, показывающих роль кровососущих насекомых в передаче этих заболеваний. Результаты экспериментов Шагаса, опубликованные в 1907-1912, пролили свет на распространение американского

трипаносомоза: при введении в кровь обезьянам и морским свинкам жгутиконосцев, выделенных из пищеварительного тракта редувиидных клопов, у млекопитающих отмечали симптомы развития данного заболевания. Немного позднее, в 1921 году, братья Эдуард и Этьен Серджент опубликовали экспериментальное доказательство передачи лейшманиозов человеку москитами, принадлежащими к роду *Phlebotomus* (Cox, 2002). Важным шагом в изучении биологии трипаносоматид стали попытки выделения этих простейших в лабораторные культуры (Novy, MacNeal, 1905; Noguchi, Tilden, 1926).

Начался массовый поиск новых видов трипаносоматид в позвоночных хозяевах и насекомых-переносчиках. Описания новых видов и родов повлекли за собой изменения в таксономии. Известные на тот момент роды трипаносоматид были объединены в одно крупное семейство Trypanosomatidae (Doflein, 1901). В 1909 г. был описан паразит молочая *Leptomonas davidi*, по всем своим признакам напоминавший трипаносоматид (Lafont, 1909), который был перенесён в новый род *Phytomonas*.

Интенсивное изучение разнообразия группы и жизненных циклов трипаносоматид обусловило появление первых предположений об эволюционной истории группы. Наиболее распространённой в течение долгого времени оставалась гипотеза Леже (Dubosq, Léger 1910), в соответствии с которой моноксенные трипаносоматиды и фитомонасы рассматривались как «низшие», эволюционно ранние организмы, а диксенные паразиты позвоночных животных – как «высшие» потомки однохозяинных трипаносоматид. Эта гипотеза во многом повлияла на дальнейшее изучение группы.

Значимым обобщением сведений о разнообразии и экологии группы этого периода явилась книга «Protozoology», опубликованная в 1926 г. (Wenyon, 1926). Опираясь на сведения о жизненных циклах основных видов трипаносоматид, паразитирующих в млекопитающих, автор показал, что, по крайней мере, большинство паразитов насекомых морфологически отличаются от трипаносом и лейшманий.

В последующий период исследование биологического разнообразия группы замедлилось, и наступил период биохимического изучения трипаносоматид. В первую очередь это было связано с успехами в получении лабораторных культур жгутиконосцев (Noguchi, Tilden, 1926; Lwoff, Lwoff, 1931; Lwoff, 1940). В качестве одного из обязательных компонентов лабораторных сред для культивирования трипаносоматид в течение долгого времени использовалась цельная кровь. Однако Маргарита Львофф показала, что кровь может быть успешно заменена гемом, что в дальнейшем значительно упростило работу с этими простейшими (Lwoff, 1940).

Шестидесятые годы XX века стали началом эры электронной микроскопии. Было показано, что ультраструктура трипаносоматид и бодонид во многом схожа, в частности,

удалось установить гомологию кинетопластов этих групп. На основании этого признака был организован таксон Kinetoplastida Honigberg, 1963, который объединил эти таксоны жгутиконосцев.

В 1966 г. был опубликован крупный обзор Франклина Уоллеса «The trypanosomatid parasites of insects and arachnids», в котором были обобщены данные о систематике, морфологии, географии, жизненных циклах и культивировании трипаносоматид (Wallace, 1966). В том же году была предложена новая терминология для обозначения морфотипов трипаносоматид (Hoare, Wallace, 1966). Среди них авторы выделяли *промастиготы* (рис. 1.2 А), которые характеризуются апикально расположенным жгутиком и пренуклеарным положением кинетопласта. *Хоаномастиготы* (рис. 1.2 В) обладают аналогичными признаками, но для них отмечалась укороченная в сравнении с промастиготами форма тела и углублённый расширенный жгутиковый карман. У *опистомастигот* кинетопласт располагается позади ядра, жгутиковый карман глубокий и проходит почти через всё тело клетки (рис. 1.2 С). *Трипомастиготы* имеют постнуклеарный кинетопласт, короткий жгутиковый карман, и прилегающий к наружной части мембраны клетки длинный жгутик, который образует ундулирующую мембрану (рис. 1.2 Е). У *эпимастигот* жгутик так же примыкает к боковой поверхности клетки и образует ундулирующую мембрану, однако кинетопласт располагается перед ядром (рис. 1.2 D). К *амастиготам* принято относить клетки, которые не имеют жгутика (рис. 1.2 F).

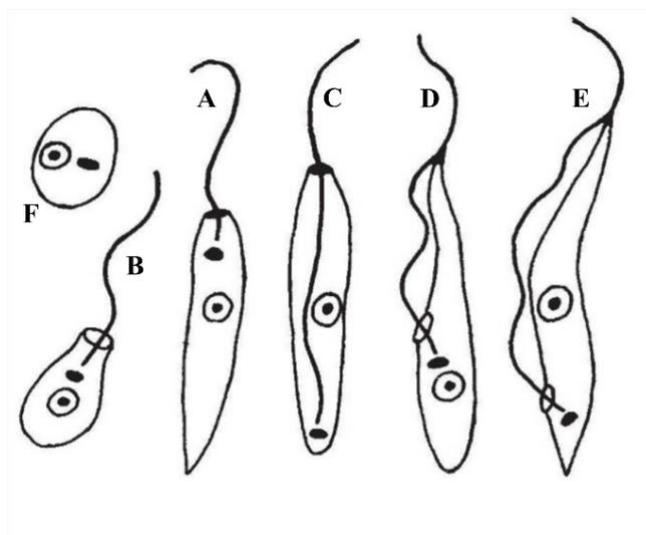


Рисунок 1.2. Классификация морфотипов трипаносоматид по Hoare, Wallace, 1966 (пояснения в тексте).

В течение долгого времени определение родовой принадлежности того или иного вида трипаносоматид базировалось именно на этой схеме в зависимости от присутствия в жизненном цикле паразита тех или иных морфотипов (таб. 1.1) (Vickerman, 1976 a, b). Большое значение в определении систематического положения трипаносоматид имел вид хозяина, в котором были обнаружены жгутиконосцы: на протяжении долгого периода изучения трипаносоматид в этой

области доминировала парадигма «один паразит – один хозяин», в соответствии с которой отношения паразитов с хозяевами рассматривались как строго видоспецифичные (Wallace, 1966; Podlipaev, 1990).

Таблица 1.1. Диагностические признаки родов семейства Trypanosomatidae. Черные кружки – диагностические признаки (по Vickerman, 1976 a, b), белые – дополнительные признаки, в том числе встречающиеся не у всех представителей рода.

	Промастиготы	Хоаномастиготы	Опистомастиготы	Амастиготы	Эндомастиготы	Эпимастиготы	Трипомастиготы	Моноксенные	Паразиты растений	Паразиты позвоночных
<i>Blastocrithidia</i>				○		•		•		
<i>Crithidia</i>	○	•			○			•		
<i>Endotrypanum</i>	•			•		•	•			•
<i>Herpetomonas</i>	•		•		○			•		
<i>Leishmania</i>	•				•					•
<i>Leptomonas</i>	•			○	○			•		
<i>Phytomonas</i>	•			○					•	
<i>Rhynchoidomonas</i>				○		○	•	•		
<i>Trypanosoma</i>	○				○	•	•			•

С началом эры молекулярно-биологических методов взгляды на систему и происхождение трипаносоматид подверглись пересмотру. К 1990 годам на основании молекулярно-генетических исследований была предложена гипотеза, в соответствии с которой диксенные паразиты позвоночных – роды *Trypanosoma* и *Leishmania* – представляют две независимые ветви (Vickerman, 1994). Эта гипотеза так же подтвердилась ультраструктурными данными (Фролов, 1993). Между тем, методы молекулярной биологии в изучении трипаносоматид с 90х гг. XX в. в значительной степени облегчили работу с этими объектами. Исследователи получили инструменты для быстрой и надёжной идентификации, изучения биоразнообразия, биогеографических исследований. Многие подходы к описанию новых родов и видов, в том числе – одна из ключевых концепций «один паразит – один хозяин», подверглись критике (Wallace, 1966; Подлипаев, 1990; Votýpka et al., 2015). Более того, было показано, что гостальная специфичность трипаносоматид варьирует от «строгой» до «крайне широкой», и

даже в пределах одного рода может сильно различаться (Tůč et al., 2013; Votýpka et al., 2015; Frolov et al., 2021). Молекулярно-генетические исследования позволили выявить множество новых эволюционных ветвей семейства, в числе которых роды *Jaenimonas*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma* (Svobodová et al., 2007; Flegontov et al., 2013; Hamilton et al., 2015; Kostygov et al., 2020). Особенно интересен род *Paratrypanosoma*, в состав которого на сегодняшний день входит всего один вид *P. confusum*, занимающий базальное положение в основании филогенетического дерева всего семейства и наиболее близкий к роду *Trypanosoma* (Flegontov et al., 2013).

Современная система трипаносоматид до сих пор несовершенна и находится в разработке. В последние годы многие роды в составе группы были объединены в 6 подсемейств: Paratrypanosomatinae, Trypanosomatinae, Blechomonadinae, Phytomonadinae, Strigomonadinae, Leishmaniinae (рис. 1.3) (Kostygov et al., 2020). Однако продолжают описываться новые виды и роды, которые не входят в число вышеперечисленных подсемейств, поэтому работа над систематикой группы далека от завершения.

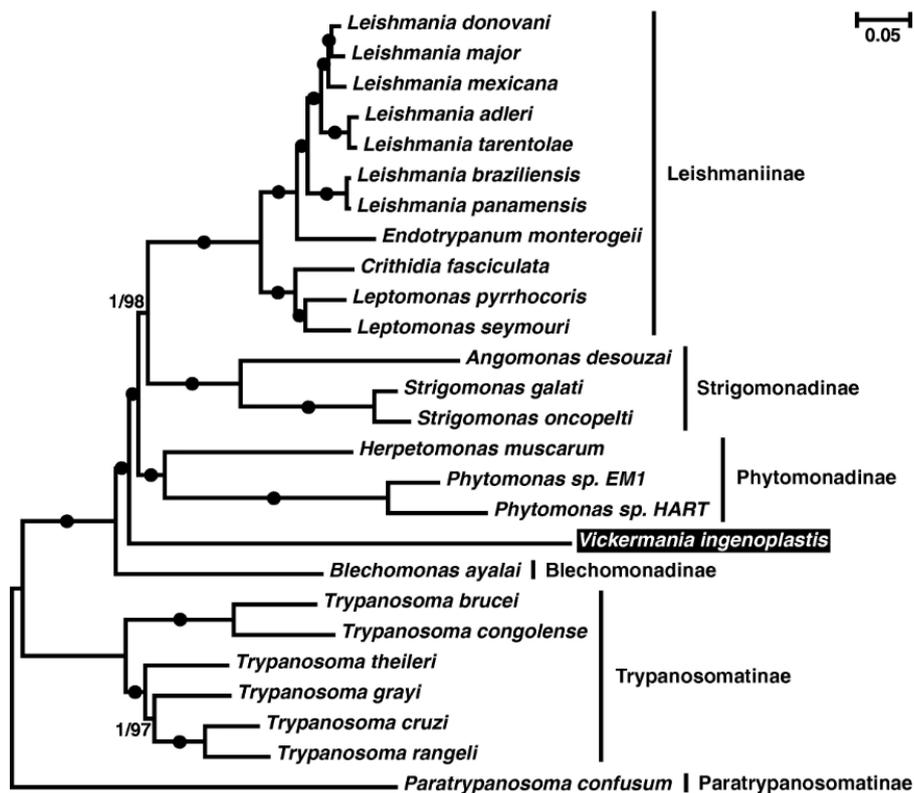


Рисунок 1.3. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки; значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены черными кругами. Масштабная линейка обозначает количество замен на сайте. По: Kostygov et al., 2020.

1.3 История изучения симбионтсодержащих трипаносоматид

Симбиотические отношения эукариотических организмов с прокариотами чрезвычайно распространены в различных эволюционных линиях. Как правило, взаимодействия подобного рода расширяют адаптивный потенциал обоих членов симбиотической ассоциации и открывают им новые перспективы в освоении природных ресурсов. Среди трипаносоматид на сегодняшний день достоверно описаны всего 2 группы симбионт-содержащих жгутиконосцев: это представители подсемейства Strigomonadinae, которое включает три рода: *Angomonas*, *Strigomonas* и *Kentomonas* (Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014), а также род *Novyomonas*, входящий в состав подсемейства Leishmaniinae (Kostygov et al., 2016).

Однако анализ ранних литературных источников показывает, что симбиоз с бактериями, по-видимому, в пределах этого семейства встречается гораздо чаще. Впервые симбионт-подобные структуры были отмечены Проважеком в 1904 г. В работе, посвящённой изучению строения *Herpetomonas musca-domesticae* из кишечника мухи *Musca domestica*, он приводит описание морфологии жгутиконосца и отмечает ряд необычных особенностей: первая заключается в преобладании популяции паразитов, обнаруженных в кишечнике насекомого, крупных двужгутиковых форм; вторая связана с присутствием в задней части клетки нечёткой гранулы в форме «удвоенного зерна» («undeutlichen doppelcorn»), которая удваивается перед делением клетки. Эта структура получила название диплосомы, и трактовалась автором как элемент локомоторного аппарата, который связан с блефаропластами (кинетопластами) посредством цитоплазматических тяжей. Особые клетки с двумя жгутиками, соединёнными между собой боковыми поверхностями, предлагались в качестве диагностического признака для рода *Herpetomonas* (Prowazek, 1904). Однако многие авторы впоследствии критиковали эту идею, утверждая, что клетки бифлагеллат представляют собой не что иное, как делящиеся формы (Patton, 1908; Mackinnon, 1910).

Подобные плотные гранулы так же неоднократно упоминаются в серии работ Фредерика Нови и его соавторов (Novy, MacNeal, 1905; Novy, 1906; Novy et al., 1907). При описании нового вида трипаносоматиды *Trypanosoma (Herpetomonas) culicis* (совр. *Strigomonas culicis*) авторы уделяют особое внимание палочковидной диплосоме в задней части клетки паразита (Novy et al., 1907). Отмечено, что их количество варьирует от одного до двух, но никогда – более; кроме того, удвоение числа диплосом как правило предшествует дубликации прочих органелл клетки (ядер и кинетосом – «блефаропластов»). В настоящее время подтверждено, что *S. culicis* действительно имеет бактериальных симбионтов в своей цитоплазме, так что публикацию 1907 г. можно считать первой достоверной записью о наличии цитоплазматических симбионтов (рис. 1.4 А, В). Жгутиконосцы, описанные авторами как *Trypanosoma grayi* (рис. 1.4 С) и *T. laverani*

(рис. 1.4 D) (Novy and MacNeal, 1905; Novy, 1906) в соответствующих публикациях также упоминаются как паразиты, обладающие диплосомами, но до сих пор эти данные пока не получили прямого подтверждения. Работы Нови с соавторами особенно интересны тем, что в них приводятся фотографии трипаносоматид, позволяющие взглянуть не на авторские рисунки, а на реальные клетки оригинальных микропрепаратов.

В 1913 г. палочковидные структуры вновь были описаны в клетках двужгутиковых трипаносоматид, идентифицированных как *H. musca-domesticae*, и получили название биполярных телец. При этом отмечается явное сходство формы и окраски биполярных телец с бактериями, которые обитали в питательной среде наравне с трипаносоматидами (Wenyon, 1913). Веньон первым выдвинул предположение о том, что биполярные тельца являются бактериями с цитоплазматической локализацией, однако был уверен, что они представляют собой пищу протистов. При этом оставался ряд вопросов, связанных со способом поглощения и выведения непереваренных остатков, в связи с которыми Веньон предполагал наличие цитостома на переднем конце клетки жгутиконосца (Wenyon, 1913).

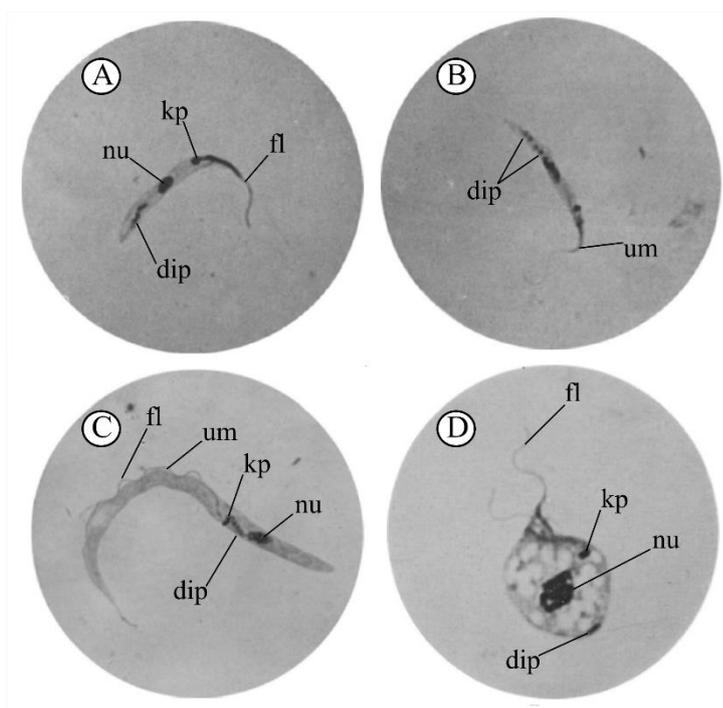


Рисунок 1.4. Морфология трёх видов трипаносоматид на сухих мазках (окр. по Романовскому). А, В – эпимастиготы *Trypanosoma (Herpetomonas) culicis* (по: Novy et al., 1907); С – трипوماстигота *T. grayi* (по: Novy and MacNeal, 1905); D – эпимастигота *T. laverani* в процессе деления (Novy, 1906).

dip – диплосома, fl – жгутик, kp – кинетоласт, nu – ядро, um – ундулирующая мембрана

Спустя 10 лет Беккер опроверг предположение о возможности поглощения бактерией клетками *H. musca-domesticae*, отметив, что при отсутствии выраженного цитостома, а также других плотных пищевых телец в цитоплазме, жгутиконосцы с большой долей вероятности являются сапрофитами. В качестве альтернативного объяснения Беккер предполагает, что биполярные тела – это фрагменты деградирующего ядра гибнущих клеток (Becker, 1923).

В 1926 г. в свет вышла работа, посвящённая успешному культивированию шести изолятов трипаносоматид на лабораторных средах (Noguchi, Tilden, 1926). В числе этих изолятов присутствовал *H. oncopelti*, выделенный из кишечника клопа, вероятно, *Oncopeltus sp.* Во многом эта публикация заложила основы лабораторного культивирования трипаносоматид и стала началом нового этапа изучения их биохимии. Разработки составов лабораторных сред дали возможность исследователям иметь постоянный доступ к живым клеточным линиям. Маргарита Львофф обратила внимание на интересную особенность *H. oncopelti*: было показано, что, в отличие от других видов трипаносоматид, он имеет более скромные потребности в нутриентах, в том числе способен существовать в среде, которая содержит пептон и трипсин, но при этом не содержит крови/гемина. Именно эта особенность легла в основу создания отдельного подрода *Strigomonas* (Lwoff, Lwoff, 1931; Thomson, Robertson, 1932), статус которого в дальнейшем был повышен до родового (Lwoff, 1935). Позднее, в 1956 г. был проведён более подробный анализ пищевых потребностей этого паразита, итогом которого стала разработка состава оптимальной питательной среды (Newton, 1956). Среди известных на тот момент лабораторных сред, среда для роста *S. oncopelti* отличалась наиболее простым составом: она не включала гемина, а из необходимых аминокислот присутствовал только метионин. В дальнейшем было показано, что метаболизм ацетатов *S. oncopelti* в значительной степени схож с таковым у бактерии *Escherichia coli* (Newton, 1957).

В том же году выходит в свет публикация, посвящённая исследованию ультраструктуры биполярных телец *S. oncopelti*. Авторы обратили внимание на явную синхронизацию удвоения этих структур с началом деления клетки жгутиконосца, и впервые описали чётко выраженную мембрану, которая покрывает биполярные тела снаружи, однако не выдвинули никаких предположений о природе биполярных тел (Newton, Horne, 1957). Позднее, в 1961 г., Пайн, изучив ультраструктуру *S. oncopelti*, пришёл к выводу, что она схожа с ультраструктурой симбиотических бактерий инфузорий (Рупе, 1961), и, следовательно, биполярные тела являются бактериальными симбионтами. Однако эта работа не получила широкой известности.

Более цитируемой стала публикация, которая вышла годом позднее. В ней был отмечен ряд необычных биохимических особенностей этого паразита (который к этому времени был перемещён в род *Herpetomonas* на основании ряда морфологических признаков, а ещё позднее – в род *Crithidia*), в частности необычный для протистов метаболический путь биосинтеза лизина, который по совокупности процессов оказался ближе к бактериальным. Авторы так же продемонстрировали, что активность декарбоксилаз, необходимых для биосинтеза лизина, ассоциирована именно с биполярными телами этого жгутиконосца. Эти две особенности снова позволили предположить, что биполярные тела являются бактериальными симбионтами (Gill, Vogel, 1962).

На протяжении 70х гг. накапливается немало подтверждений бактериальной природы биполярных тел. Гуттериндж и Макадам провели подробное исследование ультраструктуры этих образований в клетках *C. oncopelti*, и пришли к выводу, что биполярные тела – это бактерии, окружённые двойной мембраной и лишённые клеточной стенки наподобие риккетсиоподобных симбионтов (*Wolbachia spp.*) из клещей (Gutteringe, Macadam, 1971). Появились данные о том, что в биполярных телах локализуются рибосомы бактериального типа (Зайцева, Салихов, 1973; Кострикина и др., 1974). Были описаны ещё два вида симбионтсодержащих трипаносоматид: *Blastocrithidia culicis* (Chang, 1974) и *C. deanei* (Carvalho, 1973). В дальнейшем удалось продемонстрировать чувствительность эндосимбионтов всех трёх видов жгутиконосцев к антибиотику хлорамфениколу: длительное культивирование в присутствии антибиотика позволяло получить апосимбионтные штаммы трипаносоматид, которые были более требовательны к составу питательного субстрата (Зайцева, Салихов, 1973; Chang, 1974; Mundum, Roitman, 1977).

Большой интерес представляет работа Бруна, посвящённая изучению ультраструктуры нескольких видов трипаносоматид. Среди прочих автор описывает ультраструктуру паразита, определённого им как «*Herpetomonas muscarum*», полученного им из мух-каллифорид *Chrysomya chloropiga* в Африке. Эти паразиты в массе заселяли среднюю кишку насекомого. Среди морфотипов «*H. muscarum*» автор выделяет крупные удлинённые промастиготы с выраженным 1 или 2 жгутиками (Brun, 1974), аналогичные формам, описанным Проважеком семидестью годами ранее (Prowazek, 1904). При изучении ультраструктуры «*H. muscarum*» Брун обращает внимание на симбионтоподобные структуры в задней части клетки промастигот из кишечника хозяина: как правило, они занимают постнуклеарное положение, образуя группу по 3-6 штук. Отмечены 2 типа таких симбионт-подобных телец. Бактерии первой группы по своей ультраструктуре аналогичны эндосимбионтам *C. oncopelti*, они лишены клеточной стенки и окружены двойным слоем мембран. Микроорганизмы второго типа имеют клеточную стенку, которая располагается между двумя мембранами. Клеточная стенка, описываемая автором, изнутри пронизана сетью каналов. В некоторых случаях эти структуры окружены сетью митохондриальных ветвей. К сожалению, автору не удалось получить культуру этих жгутиконосцев, и более тщательное изучение этих симбионт-подобных тел невозможно (Brun, 1974).

С 1980 гг. началось интенсивное и всестороннее изучение биологии симбионтсодержащих трипаносоматид и их взаимодействий с бактериальными симбионтами. Как отмечалось выше, всего на тот момент были широко известны три вида культивируемых симбионтсодержащих трипаносоматид: *B. culicis*, *C. deanei* и *C. oncopelti*. Многочисленные исследования показали тесную связь биохимии и физиологии жгутиконосца и эндосимбионта.

Была отмечена явная синхронизация удвоения бактерии с началом деления трипаносоматид (Калинникова, 1974; McGhee, Cosgrove, 1980). Ранние сведения о нетребовательности симбионт-содержащих трипаносоматид к составу питательных сред нашли своё подтверждение в данных, согласно которым симбионты способны синтезировать ряд метаболитов (витаминов, гемина, аминокислот, пуринов и т.д.) и снабжать ими своего хозяина (Alferi, Camargo, 1982; Roitman, Camargo, 1985; de Mendes, Roitman, 1991).

В 1989 г. были описаны и изолированы в лабораторную культуру ещё два вида симбионт-содержащих трипаносоматид – *C. desouzai* и *H. roitmani*. Изначально авторы обратили внимание на нетребовательность этих организмов к нутриентам лабораторных сред (культуры росли без гемина, некоторых аминокислот и витаминов) и предположили, что они могут иметь бактериальных эндосимбионтов (Fiorini et al., 1989). Позднее изучение ультраструктуры подтвердило эти догадки (Motta et al., 1991; Silva et al., 1991).

Совокупность ультраструктурных данных позволила выделить комплекс морфологических признаков, которые отличали симбионт-содержащих трипаносоматид от остальных представителей семейства. Было показано, что симбионт-содержащие виды характеризуются отсутствием парафлагеллярного тяжа в свободной части жгутика (который тем не менее можно обнаружить в редуцированном виде в самом основании жгутика), рыхлым кинетопластом и необычайно разветвлённым митохондрионом, ветви которого перемежаются с нерегулярными субпелликулярными микротрубочками тубулеммы (Motta et al., 1991; Silva et al., 1991; de Sousa, Motta, 1999).

Тем не менее, совокупность этих данных не стала основанием для объединения симбионт-содержащих трипаносоматид в единый таксон. Как упоминалось выше, морфологические характеристики, а именно – присутствие на протяжении жизненного цикла жгутиконосца тех или иных морфотипов, служили определяющим признаком для родовой идентификации трипаносоматид, в связи с чем таксономическое положение симбионт-содержащих видов было спорным. В 1991 г. был организован новый род *Angomonas* (Souza, Côte-Real, 1991), куда было предложено включить *C. deanei* на основании строения необычных хоаномастигот с постнуклеарным положением кинетопласа. Авторы обозначили эти своеобразные формы как опистоморфы. Позднее было предложено восстановить род *Strigomonas* для размещения *C. oncopelti*, и объединить *C. deanei* и *C. desouzai* в род *Angomonas* на основании сходства их морфологии и особенностей кДНК (Brandão et al., 2000). Однако это предположение не было принято, вероятно, из-за отсутствия сопутствующих таксономических данных.

С 90х гг. методы молекулярно-генетического и филогенетического анализа становятся всё более доступными, что превращает их в мощный инструмент для исключения или создания

новых родов и видов трипаносоматид. Оказалось, что все виды симбионт-содержащих трипаносоматид на филогенетических деревьях группируются вместе и четко отделены от других видов родов *Crithidia*, *Herpetomonas* и *Blastocrithidia*, к которым они традиционно относились. Эти результаты говорили в пользу предположения о полифилии трех родов (Hollar et al. 1998; Maslov et al. 2010; Merzlyac et al. 2001; Svobodov á et al. 2007; Yurchenko et al., 2008). Наконец, в 2011 г. симбионтсодержащие трипаносоматиды были распределены между родами *Strigomonas* и *Angomonas* (Teixeira et al., 2011). Спустя 3 года был описан ещё один симбионтсодержащий род трипаносоматид – *Kentomonas*, в состав которого входил один вид *K. sorsogonicus*, и несколько природных изолятов. *K. sorsogonicus* обладал тем же комплексом морфологических особенностей, который был ранее выявлен для симбионт-содержащих трипаносоматид, и формировал сестринскую ветвь по отношению к родам *Strigomonas* и *Angomonas* на филогенетических деревьях. Эти данные послужили основанием для объединения всех эндосимбионтсодержащих трипаносоматид в новое подсемейство Strigomonadinae (Votýpka et al., 2014).

В 2016 г. была описана ещё одна интересная симбиотическая ассоциация трипаносоматид. Необычный жгутиконосец *Novumonas esmeraldas*, в цитоплазме которого присутствовали бактериальные симбионты, был выявлен в результате масштабных фаунистических исследований в Эквадоре. Филогенетический анализ показал, что *N. esmeraldas* не имеет филогенетических связей с симбионт-содержащими трипаносоматидами подсемейства Strigomonadinae и относится к подсемейству Leishmaniinae, занимая базальное положение в пределах этой эволюционной ветви. По всей видимости, эта симбиотическая ассоциация возникла независимо от стригомонадин (Kostygov, 2016).

1.4 Подсемейство Strigomonadinae Votýpka, Yurchenko, Kostygov et Lukeš, 2014

Общая характеристика

Как упоминалось выше, подсемейство Strigomonadinae было основано на основании комплекса морфологических особенностей симбионтсодержащих трипаносоматид и филогенетическом анализе их последовательностей (Teixeira et al., 2011). На сегодняшний день в состав подсемейства включены три рода: *Angomonas*, *Strigomonas* и *Kentomonas*. Ключевым признаком подсемейства является наличие бактериальных симбионтов рода *Ca. Kinetoplastibacterium*, которые располагаются в непосредственной близости от ядра и окружены двойным слоем мембран. Считается, что общий предок стригомонадин вступил в симбиотические отношения с бета-протеобактериями семейства Alcaligenaceae (порядок Burkholderiales) (Du et al., 1994 b; Teixeira et al., 2011). Последовавшая длительная коэволюция

привела к значительным изменениям в морфологии, метаболизме и физиологии обоих партнеров данной ассоциации. Таким образом, каждая клетка жгутиконосца несет в своей цитоплазме только одну бактериальную клетку. Удвоение бактерий строго синхронизировано с делением клетки-хозяина, что приводит к вертикальной передаче симбионта (Motta et al., 2010; Catta-Preta et al., 2013). Прокариоты так же лишены клеточной стенки, предположительно, для обеспечения быстрого и интенсивного метаболического обмена с клеткой стригомонадин (Chang, 1974).

Помимо непосредственно симбионтов, стригомонадины обладают рядом уникальных морфологических особенностей, которые отличают их от апосимбионтных видов семейства. Одной из таких характерных особенностей является исчезновение тяжа в свободной части жгутика, который присутствует в редуцированном виде в расширенном основании жгутика (Motta et al., 1991; Silva et al., 1991; de Sousa, Motta, 1999). Фибриллы кДНК в кинетопласте стригомонадин расположены рыхло, в отличие от плотно упакованных стержневидных кинетопластов большинства трипаносоматид (Cavalcanti et al., 2008). Корсет субпелликулярных микротрубочек стригомонадин реорганизуется по сравнению с регулярной тубулеммой трипаносоматид других групп, образуя бреши, куда заходят ветви необычайно разветвлённого митохондрия. Предположительно обширное ветвление митохондрий может быть следствием повышенного потребления энергии в сравнении с апосимбионтными видами трипаносоматид (Freymuller, Camargo, 1981; Votýpka et al., 2014).

Бактериальные симбионты трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae относятся к бета-протеобактериям порядка Burkholderiales, формируя чётко очерченный род *Ca. Kinetoplastibacterium* (Teixeira et al., 2011) (табл. 1.2).

Таблица 1.2. Виды стригомонадин и их бактериальные эндосимбионты

Стригомонадины	Эндосимбионты
<i>Angomonas deanei</i>	<i>Candidatus Kinetoplastibacterium crithidii</i>
<i>Angomonas ambiguus</i>	<i>Ca. K. crithidii</i>
<i>Angomonas desouzai</i>	<i>Ca. K. desouzaii</i>
<i>Strigomonas culicis</i>	<i>Ca. K. blastocrithidii</i>
<i>Strigomonas galati</i>	<i>Ca. K. galatii</i>
<i>Strigomonas oncopelti</i>	<i>Ca. K. oncopeltii</i>
<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	<i>Ca. K. sorsogonicusi</i>

Разнообразие

Род *Strigomonas* Lwoff et Lwoff 1931

Данный род был предложен в 1931 г.: основанием для его создания послужила способность жгутиконосцев *S. oncopelti* выживать на лабораторных средах без содержания гемина, однако это предложение не получило поддержки. К 2011 г. накопилось много сведений о морфологии, биохимии и филогении этих жгутиконосцев, на основании чего было принято решение вернуться к этому названию. На сегодняшний день известно всего 3 вида в пределах рода: *S. oncopelti*, *S. culicis*, *S. galati*.

- *Strigomonas oncopelti* (Lwoff et Lwoff 1931) является типовым видом рода. Впервые был описан как *Herpetomonas oncopelti* и выделен в культуру в 1926 году. К сожалению, хозяин неизвестен: предположительно, культура была получена из кишечника клопа *Oncopeltus sp.* (Hemiptera: Lygaeidae), обнаруженного на южном побережье США (Noguchi, Tilden 1926). Являлся модельным объектом для множества биохимических и ультраструктурных исследований, однако жизненный цикл не изучен. В культуре клетки представлены про-, хоаномастиготами и опистоморфами.

- *Strigomonas culicis* (Wallace et Johnson, 1961) был изолирован из кишечника комара *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae), пойманного в Минесоте, США. Морфология жгутиконосца соответствует морфологии ранее описанного жгутиконосца *Herpetomonas culicis* (Novy et al. 1907). Изначально был помещён в р *Blastocrithidia*, куда были включены все моноксенные жгутиконосцы, для которых были отмечены эпимастиготы (Wallace and Johnson 1961). Филогенетический анализ показал принадлежность паразита к роду *Strigomonas* наравне с другими видами (Teixeira et al., 2011).

Серия экспериментов продемонстрировала, что *S. culicis* обладает крайне необычным для стригомонадин жизненным циклом: будучи способным заражать *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), он колонизирует среднюю кишку насекомого и разрушает её стенку, проникает в гемоцель, и впоследствии проникает в слюнные железы (Corrêa-da-Silva et al., 2006; Nascimento et al., 2010). Крайне интересен тот факт, что *S. culicis* способен выживать в макрофагах человека, активность которых была снижена вирусом иммунодефицита человека (Barreto-de-Souza et al., 2008).

- *Strigomonas galati* (Teixeira et Camargo, 2011) был выделен в культуру из кишечника *Lutzomyia almerioi* (Diptera: Phlebotominae) в Бразилии. В культуре клетки представлены в основном про-, хоано- и опистомастиготами. Позднее был обнаружен в клопе

Leptocorisa acuta (Hemiptera: Alydidae) в Папуа Новая Гвинея (Králová et al., 2018) и моските *Lutzomyia almerioi* (Diptera: Phlebotominae) в Бразилии (Shaw et al., 2018).

Род *Angomonas* de Souza and Corte-Real, 1991

Род был организован в 1991 г. Основанием для его выделения послужило присутствие в популяции культуры *A. deanei* необычных хоаномастигот с постнуклеарным положением кинетопласа, названных опистоморфами. Позднее родовой статус был подтверждён на основании филогенетических данных.

- *Angomonas deanei* (Carvalho 1973). Впервые этот вид был выделен из кишечника редувиидного клопа *Zelus leucogrammus* (Hemiptera, Reduviidae) в Бразилии. В культуре клетки представлены в основном про-, хоано- и опистомастиготами. Молекулярный анализ показал, что генетические последовательности жгутиконосца, описанного как *Herpetomonas roitmani* из кишечника мухи-журчалки *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae), полностью идентичны *A. deanei*.

Впоследствии жгутиконосец был неоднократно обнаружен в мухах семейств Calliphoridae, Muscidae, Syrphidae и Sarcophagidae в африканских регионах (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).

- *Angomonas desouzai* (Fiorini et. al. 1989) изначально был изолирован из кишечника мухи *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae) в Бразилии. В культуре клетки представлены в основном про-, хоано- и опистомастиготами. Дальнейшие фаунистические исследования показали широкое распространение этого вида среди мух семейств Sarcophagidae, Calliphoridae, Syrphidae, ограниченное регионами Южной Америки (Tůč et al., 2013; Borghesan et al., 2018)

- *Angomonas ambiguus* (Teixeira et Camargo 2011). Вид был изолирован из кишечника мухи *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) в Бразилии. В культуре клетки представлены в основном про-, хоано- и опистомастиготами. Их всех ангомонасов этот вид является наиболее редким, в ходе фаунистических исследований вид был выявлен в мухах семейств Calliphoridae, Muscidae, Syrphidae и Sarcophagidae в регионах Африки и Папуа Новой Гвинеи (Tůč et al., 2013; Borghesan et al., 2018).

Род *Kentomonas* Votýpka et Lukeš 2014

Род был основан в 2014 г. и на сегодняшний день включает только один описанный вид *K. sorsogonicus*. Является хорошо поддерживаемой монофилетической группой моноксенных трипаносоматид.

- *Kentomonas sorsogonicus* (Votýpka et Lukeš 2014) впервые был изолирован из кишечника мухи *Sarcophaga sp.* (Diptera: Sarcophagidae) на Филиппинах. Клетки как правило представлены типичными про- и хоаномастиготами с варьирующим положением кинетопласта (Votýpka et al., 2014).

В дальнейшем жгутиконосцы рода *Kentomonas* так же были обнаружены в мухах семейств Lauxaniidae и Sarcophagidae в Эквадоре и Филиппинах (Votýpka et al., 2014), в мухах цеце *Glossina fuscipes* (Diptera: Glossinidae) в Центральноафриканской республике (Votýpka et al., 2021).

1.5 Род *Novumonas* Kostygov et Yurchenko 2015

Общая характеристика

Род *Novumonas* был основан в 2015 г. и на сегодняшний день включает только один описанный вид *N. esmeraldas*. На филогенетическом дереве семейства он занимает уникальное положение, находясь в базальной части подсемейства Leishmaniinae. Эндосимбионты *N. esmeraldas* принадлежит к роду *Pandoraea* в семействе Burkholderiaceae и, следовательно, лишь отдаленно родственны симбионтам стригомонадин – роду *Ca. Kinetoplastibacterium*, которые принадлежат к семейству Alcaligenaceae (порядок Burkholderiales). Ещё одно отличие от стригомонадин заключается в непостоянном числе эндосимбионтов, которое варьирует от 0 до 15, и у большинства составляет от 2 до 6. В случаях, когда бактерий немного, они концентрируются в области ядра жгутиконосца, но у большинства паразитов распределены по всей клетке (Kostygov et al., 2016).

Эндосимбионты *N. esmeraldas* снаружи окружены мембраной симбионтофорной вакуоли. Имеют оболочку, типичную для граммотрицательных бактерий: внутреннюю цитоплазматическую мембрану и относительно тонкую клеточную стенку с периплазматическим пространством между ними (Kostygov et al., 2016).

В целом *N. esmeraldas* не имеет какого-либо уникального комплекса морфологических признаков напоподобие стригомонадин, кроме разветвлённого митохондрия. По всей

видимости, данная симбиотическая ассоциация сформировалась недавно относительно стригомонадин (Kostygov et al., 2016).

Разнообразие

- *Novymonas esmeraldas* (Votýpka, Kostygov, Maslov, and Lukeš 2016). Изолят был получен из кишечника клопа *Niesthrea vincentii* (Hemiptera: Rhopalidae) в Эквадоре в 2008 г. В кишке паразит представлен хоаномастиготами, в культуре присутствуют промастиготы, хоаноматистоты и редкие амастиготоподобные формы.

Этот вид так же был обнаружен в кишечнике клопов *Chaetodus rutilans* и *Lasiomiris albopilosus* (Hemiptera, Miridae) в Папуа Новая Гвинея (Králová et al., 2018), и в мухе цеце *Glossina fuscipes* (Diptera: Glossinidae) в Центральноафриканской Республике (Votýpka et al., 2021).

1.6 Происхождение и филогения бактериальных симбионтов трипаносоматид

Симбионты трипаносоматид относятся к бета-протеобактериям порядка Burkholderiales. Эндосимбионты трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae образуют единый кластер в пределах семейства Alcaligenaceae и включены в чётко очерченный род *Ca. Kinetoplastibacterium* (Teixeira et al., 2011; Alves et al., 2013 a; Votýpka et al., 2014). Симбионты стригомонадин имеют единое происхождение, которое является следствием однократного возникновения симбиотической ассоциации, имевшего место в позднем меловом периоде (Du et al., 1994; Teixeira et al., 2011). В связи с тем, что бактерии *Ca. Kinetoplastibacterium* передаются только вертикально, дивергенция симбионтов на филогенетических деревьях в целом отражает дивергенцию стригомонадин. Наиболее ранним ответвлением является симбионт *K. sorsogonicus* – *Ca. K. sorsogonicusi*, в то время как симбионты родов *Angomonas* и *Strigomonas* демонстрируют более позднее расхождение (Alves et al., 2013 a; Votýpka et al., 2014; Silva et al., 2018; Skalický et al., 2021).

Единственным исключением из данной модели совместного видообразования является симбионт жгутиконосца *A. ambiguus*. Будучи сестринским видом *A. desouzai*, *A. ambiguus* содержит бактерию, последовательности генов (16S рРНК и gGAPDH) которой идентичны соответствующим последовательностям генов симбионта *A. deanei* (это несоответствие отразилось в названии описанного жгутиконосца: в переводе с латыни «ambiguum» переводится как «неоднозначный») (Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2018). Анализ геномов симбионтов *A. deanei* и *A. desouzai* также подтвердил принадлежность этих бактерий к одному виду, что, по всей видимости, является результатом однократного горизонтального перехода эндосимбионта

от *A. deanei* к *A. ambiguus*. Это явление получило название «захват эндосимбионта» – endosymbiont capture (по аналогии с «захватом органелл» – замещением митохондрий или пластид одного вида органеллами другого). Вероятнее всего, подобный межвидовой трансфер мог произойти при заражении мясной мухи двумя видами паразита – *A. deanei* и *A. ambiguus*, и филогенетическое родство жгутиконосцев способствовало успеху подобного перехода (Skalický et al., 2021).

Симбионт *N. esmeraldas* относится к семейству Burkholderiaceae и входит в состав широко распространённого рода *Pandoraea*. Изначально данная ассоциация «симбионт-жгутиконосец» считалась результатом недавнего события (Kostygov et al., 2014), однако более поздние геномные исследования показали глубокую метаболическую кооперацию между геномами обоих участников этой системы (Zacharova et al., 2021).

1.7 Особенности геномов бактериальных симбионтов трипаносоматид

Геномы эндосимбионтов трипаносоматид (как симбионтов стригомонадин, так и *N. esmeraldas*) демонстрируют сходные эволюционные тенденции, характерные для многих прокариотных симбионтов:

1. заметное уменьшение размеров генома;
2. снижение процента содержания G/C-оснований;
3. потеря генов регуляции транскрипции (возможно, из-за стабильности внутриклеточной среды;
4. потеря генов репарации ДНК (возможно, из-за эффектов бутылочного горлышка в связи с небольшим числом бактерий, вплоть до одного симбионта на клетку);
5. обширная потеря биосинтетических метаболических способностей (за исключением тех, которые необходимы хозяину);
6. снижение или потеря псевдогенов;
7. потеря мобильных элементов генома;
8. уменьшение длины межгенных областей, часто приводящее к значительному количеству перекрывающихся генов);
9. эндосимбиотический трансфер части генов в ядро хозяина
(по: Moya et al. 2008; Nowack and Melkonian 2010; Alves et al., 2013 a, b; Motta et al., 2016; Kostygov et al., 2017; Zacharova et al., 2021)

Основные характеристики геномов бактериальных симбионтов трипаносоматид представлены в таблице 1.3. Геномы бактерий рода *Ca. Kinetoplastibacterium* значительно уменьшены в сравнении с их ближайшими несимбиотическими родственниками: геном

бактерии *Taylorella equigenitalis*, возбудителя инфекционного метрита лошадей и ближайшего известного родственника *Ca. Kinetoplastibacterium*, примерно в два раза больше по размеру и несет в два раза больше белок-кодирующих генов. Разница в размере генома гораздо более заметна по сравнению со свободноживущим *Achromobacter xylosoxidans*, размер генома которого и количество белок-кодирующих генов почти в 9 раз превышают соответствующие показатели эндосимбионтов стригомонадин (Alves et al., 2013a).

Геном симбионта *N. esmeraldas* – бэтапротеобактерии *Ca. Pandoraea novymonadis* – также уменьшен примерно в 4-5 раз в сравнении со свободноживущими и условно-патогенными бактериями из рода *Pandoraea*, однако почти в 1.2 раза крупнее геномов *Ca. Kinetoplastibacterium spp.* (таб. 1.3). Та же тенденция, связанная с минимизацией генома, отмечена и для белок-кодирующих генов, количество которых у *Ca. Pandoraea novymonadis* примерно в 4-5 раз меньше, чем у свободноживущих (Kostygov et al., 2017).

Разница в размере геномов между бактериальными симбионтами трипаносоматид и их ближайшими родственниками в основном связана с потерей генов, а не с уменьшением их размеров или длины межгенных областей (таб. 1.3). Почти все белок-кодирующие гены, сохраняющиеся у симбионтов трипаносоматид, являются однокопийными (Alves et al., 2013 a, b; Kostygov et al., 2017). В геномах эндосимбионтов сохраняются гены, кодирующие белки, которые принимают активное участие во взаимодействии с трипаносоматидным хозяином, что обычно наблюдается в других эндосимбиотических отношениях (Nowack and Melkonian 2010). Ярким примером подобного явления является потеря бактериальных генов, связанных с синтезом аминокислот, которые продуцирует жгутиконосец-хозяин: *N. esmeraldas* теряет способность синтезировать 6 аминокислот (относительно свободноживущих родственников), в то время как бактерии рода *Ca. Kinetoplastibacterium* – 13 (Alves et al., 2013 b; Zacharova et al., 2021). Тем не менее, бактерии сохраняют способность синтезировать те аминокислоты, по которым трипаносоматиды являются ауксотрофными (Alves et al., 2013 b; Kostygov et al., 2017).

Кроме того, бактерии могут терять «дублирующие» гены, участвующие во взаимопревращении метаболитов, которые присутствуют в геномах трипаносоматид-хозяев: к примеру, последние этапы некоторых метаболических путей, таких как пути синтеза лизина и триптофана, включают два гена – один в геноме жгутиконосца, другой в геноме эндосимбионта (Alves et al., 2013 b).

Таблица 1.3. Основные характеристики геномов эндосимбиотических бактерий трипаносоматид (по: Alves et al., 2013а; Kostygov et al., 2017; Silva et al., 2018). ПЭТ – протеобактериальный эндосимбионт трипаносоматид.

Сем-во	Образ жизни	Бактерия	Вид-хозяин	Длина генома Мб	GC %	Кол-во белок-кодир. генов	Кол-во генов рРНК	Кол-во генов тРНК	Кол-во псевдогенов	Средняя длина белок-кодир. генов	Средняя межгенная длина
Alcaligenaceae	Свободножив.*	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	—	7,36	65,78	6 815	10	60	0	986	94
	Эндосимб.	<i>Taylorella equigenitalis</i>	<i>Equus caballus</i>	1,70	37,42	1 556	9	38	0	1 008	82
	ПЭТ	<i>Ca. K. crithidii</i>	<i>A. deanei</i>	0,82	30,96	730	9	44	1	1 010	85
	ПЭТ	<i>Ca. K. desouzaii</i>	<i>A. desouzai</i>	0,83	30,17	742	9	43	1	1 007	87
	ПЭТ	<i>Ca. K. blastocrithidii</i>	<i>S. culicis</i>	0,82	23,55	723	9	43	7	1 004	84
	ПЭТ	<i>Ca. K. galatii</i>	<i>S. galati</i>	0,82	32,36	726	9	43	4	1 012	86
	ПЭТ	<i>Ca. K. oncopeltii</i>	<i>S. oncopelti</i>	0,82	31,23	693	9	43	20	1 017	96
	ПЭТ	<i>Ca. K. sorsogonicusi</i>	<i>K. sorsogonicus</i>	0,74	25,22	670	9	39	3	—	—
Burkholderiaceae	Свободножив.*	<i>Pandoraea sputorum</i>	—	5,74	62,80	4 850	—	65	100	986	166
	ПЭТ	<i>Ca. Pandoraea novymonadis</i>	<i>N. esmeraldas</i>	1,16	43,80	968	—	43	13	926	213

*обнаружен у пациентов с муковисцидозом.

В геномах бактерий рода *Ca. Kinetoplastibacterium spp.* отмечены потери генов, связанных с липидным обменом, в том числе тех, которые связаны с синтезом липидов клеточных мембран. Также очень большие потери произошли в кластере генов, обеспечивающих процессы биогенеза клеточной стенки (Alves et al., 2013a). Считается, что все необходимые фосфолипиды для образования клеточных мембран симбионты стригомонадин получают от жгутиконосца (Motta et al., 2013; Zacharova et al., 2021). Примечательно, что в геноме *Ca. Pandoraea novumonadis* сохраняются гены, связанные с синтезом основных компонентов клеточной стенки и фосфолипидов бактериальных мембран (в числе которых – кардиолипин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидил-L-серин) (Zacharova et al., 2021).

1.8 Особенности морфологии симбионтсодержащих трипаносоматид

Как уже упоминалось ранее, симбионтсодержащие трипаносоматиды подсемейства Strigomonadinae (роды *Kentomonas*, *Angomonas* и *Strigomonas*) обладают уникальным комплексом морфологических признаков, среди которых: отсутствие парафлагеллярного тяжа в свободной части жгутика, крупный рыхлый кинетопласт и разветвлённый митохондрион, ветви которого перемежаются с нерегулярными субпелликулярными микротрубочками тубулеммы (Motta et al., 1991; Silva et al., 1991; de Sousa, Motta, 1999; Votýpka et al., 2014).

Несмотря на то, что в свободной части жгутика стригомонадин выраженный параксиальный тяж отсутствует, он сохраняется в редуцированном виде либо в основании жгутика как у *A. deanei* и *S. culicis* (Freymuller and Camargo, 1981; Gadelha et al., 2005), либо в его свободной части, как у *K. sorsogonicus* (Votýpka et al., 2014). Редукция параксиального тяжа стригомонадин связана с утратой структурного белка PFR2, который в норме является одним из основных компонентов параксиальных тяжей трипаносоматид. Наравне с этим у стригомонадин так же отсутствует ряд минорных белков, участвующих во внутрижгутиковом транспорте, в том числе кинезины. Это может быть связано с пониженными потребностями стригомонадин в нутриентах, поступающих из внешней среды (Motta et al., 2013).

Появление гипертрофированного, необычайно разветвлённого митохондриона в настоящее время связывают с повышенной метаболической активностью симбионтсодержащих трипаносоматид. Сравнение скорости потребления кислорода между симбионтсодержащими и апосимбиотическими клетками *A. deanei* показало, что симбионтсодержащие простейшие потребляют примерно на 30% больше O_2 , чем клетки апосимбиотического штамма (Azevedo-Martins et al., 2015).

Симбионт стригомонадин часто окружён множественными гликосомами хозяина и, по-видимому, активно использует молекулы АТФ, генерируемые этими органеллами. Такая

особенность продемонстрирована для клеток *A. deanei* и *K. sorsogonicus* (Motta et al. 1997; Votýrka et al., 2014). Также отмечено, что симбионт *A. deanei* несёт на своей поверхности многочисленные молекулы АТФ-азы. Данный факт может указывать на то, что АТФ, обеспечиваемый жгутиконосцами, гидролизуется, поддерживая активный транспортный механизм в бактериальной оболочке и активные метаболические процессы в цитоплазме симбионта (Motta et al. 1997).

Эндосимбионты стригомонадин лишены клеточных стенок и окружены двойными мембранами: мембраной симбионтофорной вакуоли и собственной. Такая структура облегчает транспорт метаболитов между жгутиконосцем и симбионтом (Chang et al., 1974; Klein et al., 2013; Alves et al., 2013 a, b; Alves and D'Mello, 2017; Morales et al., 2016; Zacharova et al., 2021), а также обеспечивает контроль деления бактерии со стороны простейшего путём транспорта сигнальных молекул (Motta et al., 2013).

Морфология *N. esmeraldas* напротив по большей части не имеет каких-либо выраженных ультраструктурных особенностей, выделяющих их на фоне остальных трипаносоматид. Тем не менее, в клетках этого жгутиконосца так же, как у стригомонадин, отмечен гипертрофированный и разветвлённый митохондрион, что также является следствием повышенной метаболической активности, характерной для всех симбионтсодержащих трипаносоматид. Симбионт *N. esmeraldas* заключён в симбионтофорную вакуоль, но, в отличие от симбионтов стригомонадин, сохраняет тонкую клеточную стенку (Kostygov et al., 2016). Тем не менее, эта особенность не осложняет метаболической кооперации между жгутиконосцем и симбионтом (Zacharova et al., 2021).

1.9 Метаболическая кооперация трипаносоматид и бактериальных симбионтов

Метаболические процессы симбионтсодержащих видов трипаносоматид тесно переплетаются с метаболическими путями их симбионтов, что, в свою очередь, отражается на особенностях геномов обоих членов ассоциации. Подобная метаболическая кооперация является результатом длительной совместной эволюции. Симбиоз стригомонадин – древнее явление, поэтому их метаболизм плотно синхронизирован с метаболизмом симбионта (Alves et al., 2013 a, b). Симбиотическая ассоциация *N. esmeraldas* – *Ca. P. novumonadis* по всей видимости возникла позднее, однако анализ бактериального генома показывает, что бактерия тем не менее уже прошла период интенсивной метаболической адаптации к эндосимбиозу (Zacharova et al., 2021).

Известно, что симбионтсодержащие трипаносоматиды гораздо менее требовательны к составам лабораторных сред, в отличие от бессимбионтных видов. Ещё в ранних работах,

посвящённых биохимии симбионтсодержащих трипаносоматид, была отмечена их способность существовать в среде, которая не содержит гемина (Lwoff, Lwoff, 1931; Thomson, Robertson, 1932; Newton, 1956). Позднее также было показано, что симбионтсодержащие виды являются автотрофными по ряду витаминов, аминокислот и пуринов (Alferi, Camargo, 1982; Roitman, Camargo, 1985; de Mendes, Roitman, 1991).

Гем играет очень важную роль в метаболизме почти всех клеточных организмов (особенно аэробных), являясь кофактором многих ферментов (Panek and O'Brian, 2002; Mense and Zhang, 2006). Трипаносоматиды, как симбионтсодержащие, так и лишённые симбионтов виды, содержат гены, завершающие путь синтеза гема в клетке. Некоторые трипаносоматиды (из подсемейств *Leishmaniinae* и *Strigomonadinae*) обладают тремя последними ферментами пути синтеза гема, другие (такие как роды *Phytomonas* и *Herpetomonas*) содержат только фермент завершающего этапа. Таким образом, многие виды трипаносоматид способны синтезировать гем из его предшественников, за исключением жгутиконосцев рода *Trypanosoma*, которые потеряли все гены, связанные с синтезом гема, и *P. serpens*, который по всей видимости не нуждается в этом соединении (Kořený et al. 2013)

Симбиотические бактерии трипаносоматид содержат необходимые ферменты для производства предшественников гема, а завершающие этапы его синтеза осуществляет клетка жгутиконосца. Таким образом, симбионт-содержащие трипаносоматиды оказываются автотрофными по этому соединению (Alves et al., 2011; Motta et al., 2013; Zacharova et al., 2021). Единственное исключение из данной схемы метаболической кооперации – *Ca. K. sorsogonicusi*, симбионт *K. sorsogonicus*, который обладает лишь двумя бактериальными ферментами пути синтеза гема из девяти необходимых (Silva et al., 2018).

Геном *Ca. K. sorsogonicusi* имеет наименьшие размеры среди геномов симбионтов стригомонадин. Большинство потерь в этом геноме не оказывают существенного влияния на метаболические пути симбиотической ассоциации, за исключением генов синтеза гема. Эксперименты по культивированию *K. sorsogonicusi* на безгеминных средах подтвердили результаты геномных исследований, согласно которым, в отличие от большинства стригомонадин, он не может существовать без внешнего источника гема. Причина, по которой *Ca. K. sorsogonicusi* теряет способность к синтезу одного из ключевых метаболитов жгутиконосца, пока неясна (Silva et al., 2018). Предполагается, что кинетопластиды не обладают полным путём синтеза гема из-за токсичности его предшественников: утрата путей синтеза гема считается благоприятной для многих паразитов (Kořený et al., 2013). Однако при отсутствии более подробной информации об экологических и физиологических условиях, с которыми сталкиваются *K. sorsogonicus* и его эндосимбионт, трудно сделать какую-либо функциональную

и эволюционную интерпретацию потери пути биосинтеза гема у этих организмов (Silva et al., 2018).

Биохимическая кооперация жгутиконосцев и их симбионтов также находит своё отражение в метаболизме аминокислот: для синтеза ряда соединений требуются ферменты обоих партнеров, что ведёт к переплетению их метаболических путей (Alves, D'Mello, 2017). Симбионты стригомонадин способны к автономному синтезу таких аминокислот, как орнитин и гистидин. Синтез ряда аминокислот (лизина, триптофана, треонина, фенилаланина и тирозина) осуществляется совместно с трипаносоматидами: большая часть метаболических путей происходит при участии ферментов бактерий, в то время как жгутиконосец осуществляет лишь последние этапы синтеза этих соединений (бактерии утрачивают гены, необходимые для их реализации). Стригомонадины также способны контролировать процессы бактериального синтеза лейцина, изолейцина и валина посредством трансаминазы разветвлённых аминокислот (Alves et al., 2013 b).

Метаболизм аминокислот в ассоциации *N. esmeraldas* и его эндосимбионта изучен слабее. Показано, что как жгутиконосец, так и бактерия, сохраняют бóльшую автономность в синтезе аминокислот по сравнению с ассоциациями стригомонадин: в том числе, *N. esmeraldas* наравне с другими лейшманиинами способен самостоятельно синтезировать треонин, метионин и аргинин. Тем не менее, большая часть реакций биосинтеза лизина у *N. esmeraldas* протекает при участии ферментов его симбионта, в то время как сам жгутиконосец осуществляет только завершающие этапы этого пути (Zacharova et al., 2021). Вероятно, *N. esmeraldas* способен контролировать метаболизм аргинина и орнитина, осуществляемые *Ca. K. sorsogonicusi*, и может участвовать в завершающих стадиях биосинтеза гистидина (Kostygov et al., 2017).

Симбионтсодержащие трипаносоматиды являются автотрофными по ряду витаминов. Симбионты стригомонадин способны к синтезу рибофлавина, и участвуют в совместном с жгутиконосцем синтезе пиридоксамина, фолиевой кислоты и пантотеновой кислоты (Alves et al., 2013 b). *Ca. K. sorsogonicusi* также обеспечивает жгутиконосца рядом витаминов, среди которых тиамин, рибофлавин, биотин и пантотеновая кислота (Zacharova et al., 2021). Примечательно, что гены, необходимые для синтеза пантотеновой кислоты также, были обнаружены у апосимбионтного вида *H. muscarum* что, вероятно, является реликтовым свидетельством латерального переноса генов от некой бактерии к предку этого жгутиконосца (Klein et al., 2013).

Эндосимбионты трипаносоматид активно участвуют в метаболизме мочевины, пиримидинов и пуринов (Motta et al., 2013; Kostygov et al., 2017). Интересная ситуация складывается с путресцином – малоизученным полиамином, который связан с пролиферацией клеток. Симбионты трипаносоматид не способны синтезировать полиамины. Синтез этого

соединения может осуществляться трипаносоматидами рода *Angomonas* и рядом бессимбионтных видов, однако ген ключевого фермента этого метаболического пути отсутствует у эндосимбионтов и, что примечательно, у жгутиконосцев рода *Strigomonas* (Alves et al., 2013 b). По всей видимости, симбионты ангомонасов способны усиливать продукцию путресцина в клетках жгутиконосцев за счёт собственных белковых факторов (Frossard et al., 2006). Возникающая в результате повышенная активность ферментов, задействованных в синтезе путресцина, может быть напрямую связана с самым быстрым временем генерации среди трипаносоматид, которое у *A. deanei* эквивалентно 6 часам (Du et al., 1994; Alves et al., 2013 b).

1.10 Регуляция численности эндосимбионтов

Тесная кооперация между членами симбиотических ассоциаций также выражается в контроле трипаносоматид за численностью цитоплазматических эндосимбионтов. В клетках стригомонадин на протяжении большей части жизненного цикла присутствует только один симбионт, удвоение которого строго синхронизировано с удвоением других структурами жгутиконосца (удвоение симбионта происходит перед сегрегацией базального тела и кинетопласта, и до удвоения ядра) (Motta et al. 2010). По всей видимости, клетки стригомонадин строго контролируют деление симбионта: геномные исследования последних лет демонстрируют потерю бактериями части генов, относящихся к кластеру «биогеenez клеточной стенки, мембраны и оболочки», что частично объясняет неспособность симбионтов делиться вне клеток простейших (Motta et al. 2010; Alves et al., 2013 a).

Ещё одна значимая потеря в геномах симбионтов стригомонадин связана с белками, участвующими в формировании Z-кольца – сложного белкового комплекса, который инициирует процессы деления и цитокинеза у грамотрицательных бактерий (Motta et al. 2010). Предположительно, именно клетки трипаносоматид обеспечивают недостающие ключевые элементы для деления бактерий (Motta et al. 2013). Одним из таких элементов может являться белок ETP1, обнаруженный у *A. deanei*. Отсутствие ортологов ETP1 среди известных на сегодняшний день организмов затрудняет предсказание клеточной функции этого белка, однако показано, что действие этого белка нацелено на бактерию и гипотетически может играть роль в контроле её клеточного цикла (Morales et al., 2016).

Также существуют данные, что ингибирование клеточного цикла *A. deanei* и *S. culicis* на различных стадиях могут оказывать влияние на морфологию симбионта, а также препятствовать удвоению кольцевой ДНК или цитокинезу. Таким образом показано существование регуляторных факторов жгутиконосца, образующихся на протяжении его

клеточного цикла, необходимых для деления симбионтов и контролирующих количество бактериальных клеток (Catta-Preta et al., 2015).

N. esmeraldas, по-видимому, не имеет отлаженного генетического механизма контроля за численностью симбионтов в клетке. Отчасти это выражается в непостоянном количестве бактериальных клеток в цитоплазме жгутиконосца, которое варьирует от 0 до 15. Симбионты *N. esmeraldas* заключены в симбионтофорные вакуоли либо индивидуально, либо парами, и зачастую такие вакуоли встречаются в комплексе с лизосомами жгутиконосца на разных этапах взаимодействия. Отмечены несколько фаз взаимодействия между лизосомами и симбионтофорными вакуолями, от ранних контактов между мембранами до полного слияния этих органелл и разрушения бактериальной клетки. Таким образом, регуляция числа симбионтов в клетках *N. esmeraldas* достигается не за счёт синхронизации деления, а за счёт физического уничтожения «лишних» бактериальных клеток. Возможно, именно отсутствие строгой генетической координации клеточных циклов симбионта и жгутиконосца способствовало успешному выделению бактерии в лабораторную культуру, в то время как многочисленные попытки выделения лабораторных культур симбионтов стригомонадин не были удачными (Kostygov et al., 2016).

1.11 Влияние эндосимбионтов на клетки жгутиконосцев

Сравнение транскриптомов между штаммами трипаносоматид, имеющих симбионты, и апосимбионтными штаммами (на примере *A. deanei* и *N. esmeraldas*) показало, что присутствие эндосимбионтов модулирует экспрессию целого ряда генов жгутиконосца. В клетках апосимбионтного штамма *A. deanei* было выявлено подавление экспрессии генов, связанных с энергетическим обменом, гликосомным и митохондриальным метаболизмом, а также генов, обеспечивающих транспорт протонов, связанных с гидролизом АТФ, и передачу клеточных сигналов. Напротив, среди категорий с повышенной экспрессией отмечены гены, участвующие в протеолизе, движении микротрубочек и транспорту вдоль них, и клеточном метаболизме (Penha et al., 2016). У апосимбионтных клеток *N. esmeraldas* также подавлена экспрессия генов, связанных с энергетическим обменом и дыхательной активностью митохондрий. Отмечено снижение активности генов сборки рибосом, и генов, связанных с аутофагией (белки, участвующих в аутофагии, используются для контроля количества бактерий в клетках *N. esmeraldas*). В отличие от апосимбионтов *A. deanei*, у которых интенсивность аминокислотного, липидного и углеводного метаболизма повышается после элиминации бактерий, экспрессия генов, связанных с этими процессами, была подавлена в клетках *N. esmeraldas*, лишённых

бактерий. В то же время повышенная экспрессия отмечена для генов антиоксидантной защиты, процессов репарации ДНК, и сигнальных белков (Zacharova et al., 2021).

Помимо воздействия на метаболические процессы трипаносоматид, симбионты также оказывают прямое влияние на состав поверхностных гликопротеинов жгутиконосцев. Сравнение симбионтсодержащих и апосимбионтных штаммов *S. culicis* и *A. deanei* показало, что эти штаммы значительно различаются по составу поверхностных гликопротеинов и полисахаридов хозяина (в частности – кислых экзофосфатаз и сиаломолекул) и поверхностному заряду клетки (Esteves et al., 1982; Oda et al., 1984). Серия экспериментов по заражению различных хозяев симбионтсодержащими и апосимбионтными штаммами *S. culicis* и *A. deanei* показали, что присутствие эндосимбионта определяет способность паразита взаимодействовать с клетками хозяина. Так, апосимбионтные штаммы этих жгутиконосцев менее интенсивно взаимодействуют с культурой клеток средней кишки насекомых-хозяев, и хуже прикрепляются к ним (Fampa et al., 2003; d'Avila-Levy et al., 2005). Апосимбионтные клетки *S. culicis* медленнее пролиферируют в кишечнике хозяина непосредственно после заражения в сравнении с симбионтсодержащим штаммом и исчезают из кишечника насекомого спустя сутки с момента заражения, в то время как клетки дикого типа закрепляются в средней кишке и продолжают свой жизненный цикл. По всей видимости, эти результаты связаны с неспособностью апосимбионтных клеток паразита прикрепляться к поверхности средней кишки и слюнных желёз (Fampa et al., 2003; Catta-Pretta et al., 2013).

1.12 Горизонтальный перенос генов

Множество генов в составе ядерных геномов трипаносоматид, которые связаны с синтезом важнейших соединений, на филогенетических деревьях кластеризуются с бактериальными генами. Часть горизонтальных переносов генов является общей для всех групп трипаносоматид, чьи геномы исследованы на настоящий момент, другие оказались специфичными для определенных подгрупп.

По всей видимости, такое генетическое расхождение может являться результатом неоднократных и независимых событий горизонтального переноса генов от ассоциированных симбиотических бактерий в различных эволюционных ветвях семейства. Альтернативное предположение связано с древними событиями горизонтального переноса, которые произошли у общего предка всех трипаносоматид, но позднее часть приобретённых генов была утеряна в разных таксонах. Скорее всего, в эволюционной истории трипаносоматид в разные периоды были реализованы оба сценария (Alves et al., 2011; Alves et al., 2013 b; Klein et al., 2013).

Большое количество генов ядерного генома трипаносоматид, имеющих бактериальное происхождение, связано с процессами синтеза аминокислот. Большое количество генов, которые встречаются как у стригомонадин, так и у бессимбионтных видов (таб. 1.4), на филогенетических деревьях кластеризуются с различными ветвями бактерий типов Firmicutes и Bacteroidetes, классов Gammaproteobacteria, Actinobacteria, и бактериями семейства Alcaligenaceae. Отдельный интерес представляет ген фермента орнитинциклодеаминазы, который участвует в синтезе пролина: он был обнаружен только у трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae. Филогенетический анализ этого гена показал, что его последовательность очень похожа на гены бетапротеобактерий семейства Alcaligenaceae, к которым принадлежат эндосимбионты. Тем не менее, в геномах симбионтов стригомонадин (по крайней мере, симбионтов трипаносоматид из родов *Angomonas* и *Strigomonas*) этот ген отсутствует, что может свидетельствовать о трансфере бактериального гена орнитинциклодеаминазы в ядро хозяина, которое имело место у предковой симбиотической ассоциации (Alves et al., 2013 b).

Свидетельства горизонтальных переносов от ассоциированных бактерий в геномы трипаносоматид встречаются среди генов, связанных с синтезом гема. Как упоминалось выше, большую часть пути синтеза гема осуществляет эндосимбионт, однако последние три этапа, которые контролируются генами CPOX, PPOX и FeCH, осуществляет жгутиконосец. Данные гены были отмечены как для симбионтсодержащих трипаносоматид подсемейства Strigomonadinae, так и для многих бессимбионтных видов, которые нетребовательны к гемину, но могут синтезировать его из соединений-предшественников (Alves et al., 2011). Гены трипаносоматид, связанные с завершающими реакциями синтеза гема, имеют прокариотную природу и кластеризуются с генами бактерий класса Gammaproteobacteria. Гены CPOX и PPOX присутствуют у родов *Angomonas* и *Strigomonas*, а также трипаносоматид подсемейства Leishmaniinae (роды *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Zelonion* и *Endotrypanum*). Гены CPOX, отмеченные у разных родов трипаносоматид, образуют монофилетическую группу и скорее всего имеют общее происхождение. Гены PPOX трипаносоматид в свою очередь образуют две хорошо поддерживаемые группы, одна из которых включает группу последовательностей трипаносоматид подсемейства Leishmaniinae, а другая включает роды *Angomonas* и *Strigomonas*, что гипотетически может являться результатом двух независимых событий горизонтального переноса генов (Alves et al., 2011) (таб. 1.5).

Ген FeCH, контролирующей завершающий этап синтеза гема, встречается у более широкого спектра трипаносоматид: помимо лейшманиин и стригомонадин, он отмечен у родов *Herpetomonas* и *Phytomonas*, а также у *Parabodo caudatus* – жгутиконосца из сестринского трипаносоматидам отряда Parabodonida. Несмотря на то, что у всех исследованных

трипаносоматид и *P. caudatus* этот ген имеет гаммапротеобактериальное происхождение, в разных линиях жгутиконосцев он имеет различную филогенетическую историю. Отмечены 3 основные эволюционные линии: первая включает гены FeCH подсемейства *Leishmaniinae*, *Strigomonadinae* и род *Herpetomonas*, а гены FeCH родов *Parabodo* и *Phytomonas* формируют две независимые эволюционные линии (таб. 1.5) (Alves et al., 2011).

Таблица 1.4. Гены путей метаболизма аминокислот, возникшие у трипаносоматид в результате горизонтальных переносов (по: Alves et al., 2013; Klein et al., 2013). АСТ – апосимбионтные виды трипаносоматид

Фермент, кодируемый геном ядерного генома трипаносоматид	Подсем. <i>Strigomonadinae</i>	АСТ	Участие в метаболическом пути	Вероятное происхождение
Гомосериновая дегидрогеназа	+	+	Синтез лизина, цистеина, метионина, треонина	Firmicutes
ЕС:6.3.4.5 и ЕС:4.3.2.1	+	+	Синтез аргинина и орнитина	Firmicutes
Кетопантоатредуктаза	+	+ (Только у <i>H. muscarum</i>)	Синтез пантотеновой кислоты	Firmicutes
ЕС:3.5.1.14	+	+	Синтез аргинина и орнитина	Gamma proteobacteria/Firmicutes
ЕС:2.1.1.14	+	+	Синтез метионина	Gamma proteobacteria
Никотинатфосфорибозилтрансфераза	+	+	Метаболизм никотиновой кислоты	Gamma proteobacteria
Бета-субъединица триптофансинтазы	+	+ (Только у <i>H. muscarum</i>)	Синтез триптофана	Bacteroidetes
ЕС:2.3.1.30	+	+	Синтез цистеина и метионина	Возм. Bacteroidetes или Betaproteobacteria
Диаминопимелатдекарбоксилаза	+	+	Синтез лизина	Actinobacteria
ЕС:4.1.2.5	+	+	Взаимопревращение глицина и треонина	Ведут разное происхождение: У подсем. <i>Leishmaniinae</i> – от Firmicutes, У стригомонадин – происхождение неясно
ЕС:3.5.1.16	+	+	Синтез аргинина и орнитина	Alcaligenaceae
Орнитинциклодеаминаза	+	—	Синтез пролина	Alcaligenaceae (отсутствует у симбионтов)

Таблица 1.5. Гены пути синтеза гема, возникшие у трипаносоматид в результате горизонтальных переносов (по: Alves et al., 2011). Пояснения в тексте.

	CPOX	PPOX	FeCH
<i>Angomonas deanei</i>	+	+	+
<i>Strigomonas culicis</i>	+	+	+
<i>Strigomonas galati</i>	+	+	+
<i>Strigomonas oncopelti</i>	+	+	+
<i>Crithidia acanthocephali</i>	+	+	+
<i>Crithidia fasciculata</i>	+	+	+
<i>Endotrypanum schaudini</i>	+	+	+
<i>Zelonia costaricensis</i>	+	+	+
<i>Herpetomonas muscarum</i>	—	—	+
<i>Phytomonas sp.</i>	—	—	+
<i>Parabodo caudatus</i>	—	—	+

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Сбор и вскрытие насекомых

Сбор насекомых проводился на протяжении полевых сезонов 2016-2021 гг. на территориях Ленинградской, Новгородской, Псковской областей, республиках Карелия, Коми, Ямало-Ненецком Автономном Округе, Чукотском Автономном Округе и Камчатском крае (таб. 2.1). 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.

Таблица 2.1. Основные регионы сбора насекомых.

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

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

2.2 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 расчёта 500 ед./мл и стрептомицина 500 мкг/мл. Впоследствии культуры жгутиконосцев были очищены 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 заморожена и хранится при температуре -86 °C.

2.3 Клонирование трипаносоматид

Мы проводили клонирование трипаносоматид в том случае, если в культуре присутствовали 2 или более видов трипаносоматид, путём клонального разделения жгутиконосцев на жидкой среде. Для этого разводили лабораторные культуры до достижения концентрации «3 клетки на 0,5 мкл жидкости» и пересевали 0,1 мкл разведённой культуры в 0,5 мл среды M199 в отдельные лунки 24-луночных планшетов для культивирования. Спустя 10 суток лунки проверяли на наличие жгутиконосцев, после чего пересевали клональные культуры по стандартной схеме.

2.4 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 (Topr Tek, Hangzhou, China). Все измерения клеток и статистический анализ выполнены с помощью программы UTHSCSA Image Tool for Windows v.3.0.

2.5 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). Надосадочную 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 пересадили, и осадок окрашивали 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).

2.6 Электронная микроскопия

Для исследований в электронном микроскопе культуры жгутиконосцев, предварительно очищенных 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 обезживали 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 Jeol 1400 (ТЕМ). 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.

2.7 Выделение геномной ДНК, ПЦР, очистка фрагментов из ПЦР-смеси 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 «выделение геномной ДНК из цельной крови».

Фрагмент гена COI насекомых амплифицировали для идентификации видовой принадлежности хозяина при помощи пары праймеров HCOI2198 и LCOI1490 (Folmer et al., 1994) в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Суwinska, 2010). Фрагмент гена 18S рРНК 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 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 отсеквенированы по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в НИО Евроген. Для секвенирования были использованы ПЦР-праймеры, а также дополнительные праймеры 883F, 907R S757, и A757 (Gerasimov et al., 2012) для получения длинных фрагментов гена 18S рРНК

2.8 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) (Kumar et al., 2016), при этом неоднозначно выровненные позиции удалялись вручную. Используемые для анализа последовательности гена 18S рРНК трипаносоматид и гена 16S рРНК бактериальных симбионтов, полученные из базы GenBank, указаны в Приложении к настоящей работе.

Реконструкция деревьев по методу максимального правдоподобия была выполнена в IQ-TREE v.1.6 (Nguyen et al., 2015) с лучшей эволюционной моделью, выбранной с использованием байесовского информационного критерия встроенным ModelFinder для каждого дерева (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Поддержку ветвей оценивали методом сверхбыстрой начальной загрузки (1000 повторов) (Hoang et al., 2017). Байесовский анализ был выполнен в MrBayes

v.3.2.7 в рамках модели GTR+I+G, с анализом 2 000 000 поколений, выборка деревьев каждые 1000 поколений и другие параметры, оставленные в состояниях по умолчанию (Ronquist et al., 2003). Дерево, построенное для гена 16S рРНК бактериальных симбионтов, было реконструировано по методу присоединения соседей в программе MEGA (Felsenstein, 1985; Saitou et al., 1987; Tamura et al., 2014; Kumar et al., 2016).

2.9 Экспериментальные заражения

- Культивирование насекомых

В качестве экспериментальных хозяев мы использовали насекомых из лабораторных культур трёх видов 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. 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.

- 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 трипаносоматид (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, определялся как точка отсчёта с момента заражения.

- Продолжительная иммобилизация мух

В рамках эксперимента по выявлению продолжительности инвазии часть мух после однократного 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 выпитывала фекалии насекомого. Смена ваты производилась ежедневно.

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

- Внутривидовая трансмиссия 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 повторов.

- Межвидовая трансмиссия 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 повторов 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).

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

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

Анализ этих изолятов с применением методов флюоресцентной микроскопии (окраска DAPI) так же не позволил визуализировать каких-либо ДНК-содержащих органелл в клетках исследованных изолятов, кроме ядра и кинетопласта (рис. 3.1 А, С).

Нам не удалось обнаружить симбионт-подобные структуры на электронограммах этих трипаносоматид. Тем не менее, исследованные нами жгутиконосцы рода *Wallacemonas* имеют ряд морфологических особенностей, сближающих их со стригомонадинами. 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. 3.1 В, D).

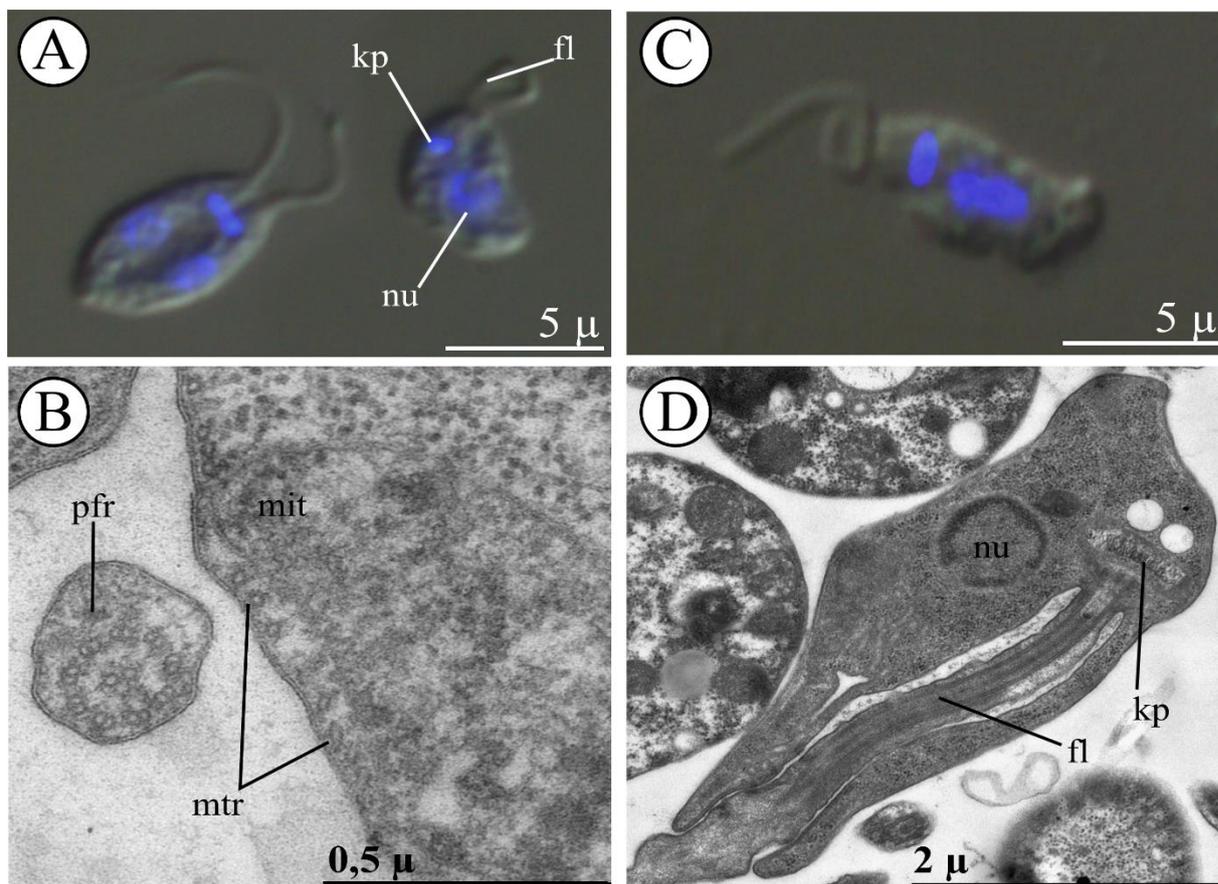


Рисунок 3.1. Морфология жгутиконосцев рода *Wallacemonas* в культуре. А – промастиготы штамма WSD (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); В – ультраструктура клеток штамма WSD (ТЭМ); С – промастигота *Wallacemonas collosoma* (Совмещённое фото ДИК- и флуоресцентной микроскопии); D – ультраструктура клеток штамма *Wallacemonas collosoma* (ТЭМ).

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

2. *Leptomonas repentinus*. Нами также был выполнен анализ архивных препаратов трипаносоматид из коллекции ЗИН РАН. Всего были изучены 46 сухих мазков, окрашенных по Гимза. Этот метод позволил выявить симбионт-подобные тела в клетках трипаносоматид, ранее описанных как *Leptomonas repentinus* (Малышева, Фролов, 2002), культура которых на данный момент утрачена.

Клетки на мазках представлены продолговатыми промастиготами, имеющими 1 или 2 длинных выраженных жгутика (рис. 3.2 А, В). В последнем случае жгутики гетероморфны по длине, и либо плотно прикрепляются друг к другу латеральными сторонами (рис. 3.2 А), либо свободны (рис. 3.2 В). Кинетопласт очень крупный, расположен в передней части клетки. У небольшой части клеток (~10%) помимо ядра и кинетопласта мы отмечали крупную, интенсивно окрашенную структуру, которая занимала постнуклеарное положение.



Рисунок 3.2. 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.

Обсуждение

Трипаносоматиды рода *Wallacemonas* представляли для нас значительный интерес в начале 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 подсемейства Strigomonadinae (Kostygov et al., 2014); (2) во-вторых, у одного из ранее описанных видов («*Leptomonas rigidus*») была описана септированная тубулемма – признак, считавшийся 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 роду *Wallacemonas*.

В работах последних лет положение трипаносоматид рода *Wallacemonas* на филогенетических деревьях очень сильно варьирует в зависимости от выбора метода построения филогенетических деревьев, а также выбора генетических маркеров и видов, включённых в анализ. Кроме того, в последние годы проводились описания новых родов и видов, которые включались на филогенетические схемы и меняли из топологию (Votůrka et al., 2020; Lukeš et al., 2021). В результате во многих работах род *Wallacemonas* позиционируется как сестринская ветвь по отношению к подсемейству Strigomonadinae (Kostygov et al., 2014; Yurchenko et al., 2021), но в некоторых случаях образует сестринскую ветвь по отношению к необычным трипаносоматидам рода *Vickermania* (Kostygov et al., 2020) или неидентифицированным природным сиквенсам (Votůrka et al., 2020). Таким образом, филогенетическое положение жгутиконосцев рода *Wallacemonas* в настоящий момент представляется неясным, и для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных геномных исследований.

В связи с неоднозначным филогенетическим положением валласемонасов, мы в настоящее время не можем достоверно говорить о том, как и почему эти организмы, обладая явными синапоморфиями симбионтсодержащих трипаносоматид подсемейства *Strigomonadinae*, не имеют цитоплазматических симбионтов. Тем не менее, мы можем предположить два альтернативных сценария, гипотетически имевших место в эволюционной истории этой группы. Если мы предполагаем, что трипаносоматиды рода *Wallacemonas* не являются эволюционно близкой ветвью подсемейства *Strigomonadinae*, то наиболее вероятно, что в этой группе симбионт-содержащие виды отсутствуют, а разветвлённый митохондрион, нарушающий регулярность тубулеммы, а также редуцированный параксиальный тяж и рыхлый кинетоплат, появляются в этой эволюционной линии независимо (что может быть связано с повышенной метаболической активностью этой группы). Напротив, если мы предполагаем, что род *Wallacemonas* и подсемейство *Strigomonadinae* – эволюционно близкие группы, то 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.

Изучение морфологии *Leptomonas repentinus* по архивным гистологическим мазкам и опубликованным микрофотографиям (Малышева, Фролов, 2002) позволяет нам сделать вывод о принадлежности этого жгутиконосца к роду *Vickermania*. Этот паразит имеет комплекс уникальных признаков, характерных для трипаносоматид рода *Vickermania*: наличие так называемых «двужгутиковых промастигот», и необычайно крупного и рыхлого кинетопласта (Kostygov et al., 2019; Kostygov et al., 2020).

На сегодняшний день в составе рода *Vickermania* описаны только 2 вида: *V. ingenoplastis* и *V. spadyakhi*, которые являются апосимбионтными (Kostygov et al., 2020). Судя по ранним ультраструктурным исследованиям, в цитоплазме *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. Известен пул природных изолятов, который на филогенетических деревьях позиционируется в пределах рода *Vickermania* (Kostygov et al., 2020). По всей видимости, эти трипаносоматиды крайне распространены в природе, но относятся к трудно-культивируемым видам, поэтому большинство из них известны только по нуклеотидным последовательностям.

Таким образом, поиск симбионт-содержащих видов рода *Vickermania* требует дальнейших масштабных фаунистических исследований.

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 3 новых изолята, последовательности которых идентичны ранее описанным видам симбионт-содержащих трипаносоматид (таб. 3.1) (рис. 3.3).

Последовательности изолятов MN и Chr 51 были полностью идентичны последовательностям *A. deanei*, а последовательность гена 18S рРНК изолята M29-9 оказалась уникальной среди нуклеотидных последовательностей базы GenBank. На филогенетических деревьях он занимает положение, промежуточное между ветвью *A. deanei* и ветвью, объединяющей два близких вида – *A. desouzai* и *A. ambiguus* (рис. 3.3).

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

Таблица 3.1. 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	<i>Calliopum elisae</i> (Diptera: Lauxaniidae)	Дер. Ляды, Псковская обл. (58°35' с. ш., 28°55' в. д.)

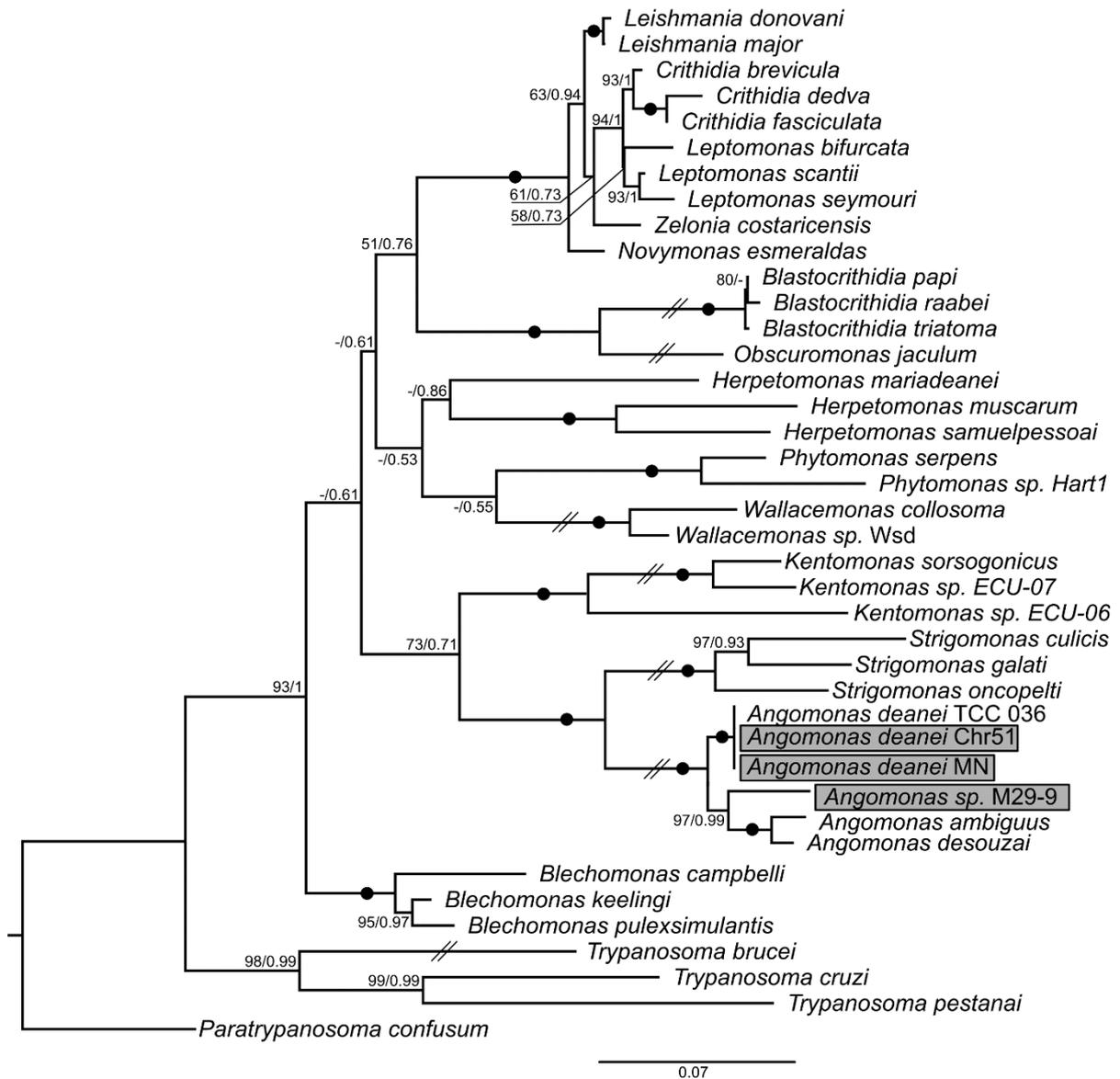


Рис. 3.3. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК (построено с использованием модели TNe+I+G4). Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки соответственно (узлы со значениями 100% и 1 указаны чёрными кругами). Значения менее 50% и 0.5 заменены прочерками. Ветви с тройным перечёркиванием сокращены на 1/3 от их первоначальной длины. Масштабная линейка показывает количество замен на 1 нуклеотид. Исследуемые изоляты выделены.

Филогенетическое дерево построено на основании 39 последовательностей. Длина итогового выравнивания составила 2438 нуклеотидов.

Обсуждение

Нам удалось обнаружить 4 изолята симбионт-содержащих трипаносоматид на севере Евразии. Два из них принадлежат к широко распространённому симбионт-содержащему виду *A. deanei* (Ганюкова и др., 2017; Ганюкова, Золотарёв., 2018; Ganyukova et al., 2019). Последовательность гена 18S рРНК третьего изолята М29-9 оказалась уникальной среди последовательностей базы GenBank. Данный изолят принадлежит к новому виду в пределах рода *Angomonas* (Zolotarev et al., 2019). Четвёртый из симбионт-содержащих изолятов относится к виду *Phytomonas borealis* (Ganyukova et al., 2020b), который принадлежит к группе преимущественно диксенных паразитов высших растений. Более подробное обсуждение этих находок приводится в следующих разделах.

3.1.3 *Angomonas deanei*

Результаты

Изолят MN был выделен в культуру из заражённой задней кишки мухи *Lucilia sp.* (Diptera: Calliphoridae), пойменной в окрестностях пос. Комарово Ленинградской области. Секвенирование гена 18S рРНК трипаносоматид из кишечника хозяина показало, что насекомое было заражено несколькими видами трипаносоматид с преобладанием *Wallacemonas sp.*, однако последующий анализ гена 18S рРНК из аксеничной лабораторной культуры показал присутствие только одного вида *A. deanei* (изолят получил код MN) (Ганюкова и др., 2017).

Аналогичная ситуация складывалась с изолятом Chr51, который был выделен из кишечника мухи *Calliphora terraenovae* (Diptera: Calliphoridae) в окрестностях села Усть-Хайрюзово на Камчатке. Анализ последовательности 18S рРНК трипаносоматид, амплифицированной из кишечника хозяина, показал смешанное заражение, но с явным преобладанием *A. deanei* (Ганюкова, Золотарёв, 2018; Zolotarev et al., 2019). К сожалению, впоследствии культура этого изолята была утеряна, и дальнейшие исследования оказались невозможными.

Морфология *Angomonas deanei* MN в культуре

- Световая микроскопия

Среди клеток аксеничной культуры изолята *A. deanei* MN мы выделили три основных морфотипа. Первый морфотип – промастиготы – характеризуется удлинённой формой, смещённым к переднему концу клетки кинетопластом и овальным ядром, которое занимает срединное положение. Промастиготы имеют относительно крупные размеры среди остальных морфотипов (рис. 3.4 А) (таб. 3.2). Жгутик хорошо выражен, его длина в среднем составляет 6 мкм. Второй морфотип – парамастиготы, ядро которых также располагается в центре клетки, а

кинетопласт занимает варьирующее положение от переднего края ядра до заднего (рис. 3.4 С). Парамасстиготы имеют меньшие размеры, длина свободной части жгутика не превышает 5 мкм. Третий морфотип – опистомасстиготы (рис. 3.4 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 (Ганюкова и др., 2017).

Таблица 3.2. Морфометрия *Angomonas deanei* MN 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
Промасстиготы	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)
Парамасстиготы	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)
Опистомасстиготы	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)

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. 3.5 А), симбионты гантелеобразной формы (рис. 3.5 В), и парные симбионты (рис. 3.5 С). Разнообразие морфотипов эндосимбионтов в данном случае отражает последовательные фазы их клеточного цикла (Ганюкова и др., 2017).

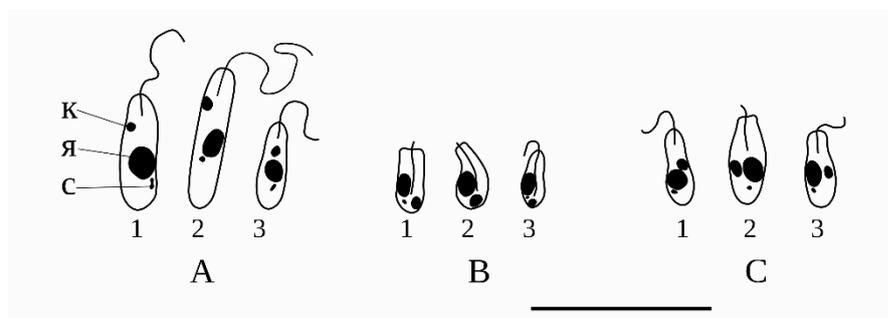


Рисунок 3.4. Разнообразие морфотипов *Angomonas deanei* MN в культуре (схема). А – промасстиготы; Б – опистомасстиготы; В – парамасстиготы.

к – кинетопласт; с – эндосимбионт; я – ядро. Масштабная линейка: А-В – 10 мкм.

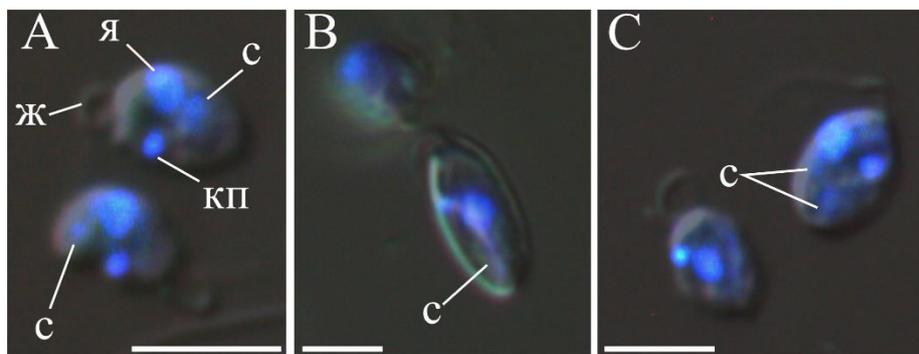


Рисунок 3.5. Совмещенное фото DIC- и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI) клеток *Angomonas deanei* MN в культуре. А – клетка с одним симбионтом в цитоплазме; В – клетка с делящимся гантелеобразным симбионтом; Г – клетка с двумя симбионтами. Масштабная линейка – 10 мкм. к – кинетопласт; с – эндосимбионт; я – ядро

- Ультраструктура *Angomonas deanei* в культуре

Ультратонкая организация клеток *A. deanei* MN является типичной для большинства изученных стигомонадин. Клетки округлой формы, с глубоким жгутиковым карманом, который может почти достигать заднего края клетки (рис. 3.6 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. 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. 3.6 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. 3.6 В). Непосредственно под плазмалеммой располагаются продольно ориентированные субмембранные микротрубочки. Микротрубочки расположены нерегулярно, в брешах между ними обнаруживаются профили митохондрия (рис. 3.6 С, Е). В отдельных ветвях митохондрия заметны немногочисленные пластинчатые кристы. В цитоплазме обнаруживаются бактериальные симбионты, заключенные в цитобионтофорные вакуоли (рис. 3.6 А, D, Е). На электронограммах отмечены профили симбионтов: единичные, неделиющиеся бактерии (рис. 3.6 А), бактерии, находящиеся в процессе деления (рис. 3.6 D), и полностью разделившиеся особи (рис. 3.6 Е) (Ганюкова и др., 2017). Крайне необычной находкой является обнаружение цитостома в основании жгутикового кармана (Ganyukova et al., 2020a), который подробно будет обсуждаться далее.

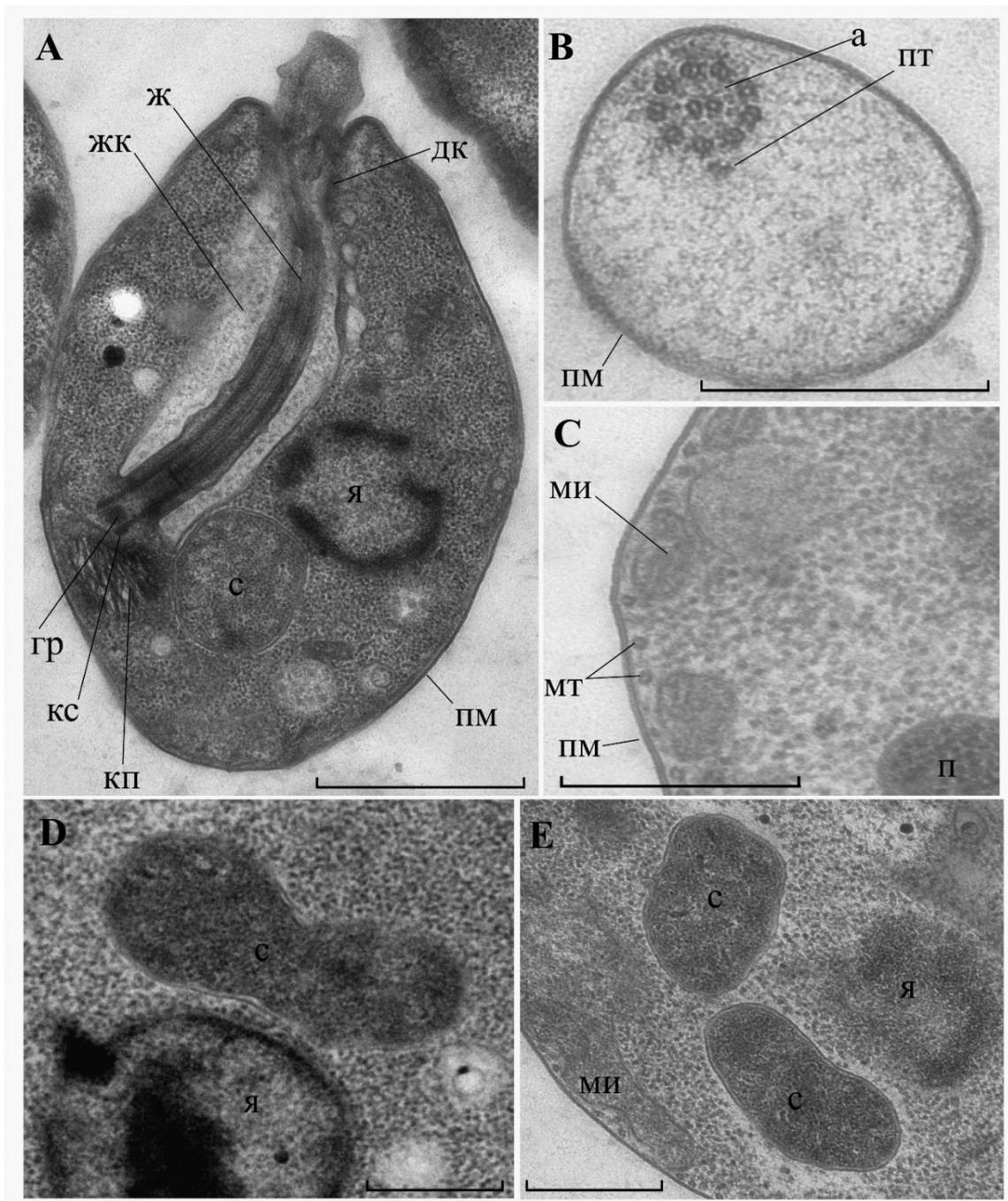


Рисунок 3.6. Ультраструктура *Angomonas deanei* MN в культуре. А – продольный срез; В – поперечный срез через основание жгутика; С – участок поперечного среза; D, E – срез на уровне ядра
а – аксонема жгутика; гр – электронно-плотная гранула; дк – десмосомоподобные контакты; ж – жгутик; жк – жгутиковый 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 мкм, D, C, D, E – 0,5 мкм.

- Филогенетический анализ

Как было указано выше, *A. deanei* MN на филогенетических деревьях группируются с другими изолятами этого вида с высокой поддержкой (рис. 3.7). Анализ последовательности гена 18S рРНК показал, что *A. deanei* MN внутри вида формирует единый кластер с многочисленными изолятами этого вида за исключением тех, которые были отнесены к редкой генотипической группе «Dea4».

Анализ последовательности бактериального гена 16S показал, что симбионт изолята *A. deanei* MN с высокой поддержкой позиционируется среди других бактерий вида *Ca. K. crithidii*, которые встречаются у *A. deanei* (рис. 3.8).

Обсуждение

Angomonas deanei был обнаружен в двух регионах: на северо-западе Ленинградской области (изолят MN) и на западном побережье Камчатки (изолят Chr51) (Ганюкова и др., 2017; Ганюкова, Золотарёв, 2018; Zolotarev et al., 2019). Впервые этот вид был выделен из кишечника редувиидного клопа *Zelus leucogrammus* (Hemiptera, Reduviidae) в Бразилии (Carvalho 1973). 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 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 *A. deanei*, по-видимому, так же широко распространён в умеренном и, возможно субарктическом поясах Евразии и, таким образом, в пределах рода является самым распространённым видом, ареал которого распространяется далеко за пределы тропических регионов (Ганюкова, Золотарёв, 2018; Zolotarev et al., 2019).

Исследование генетического разнообразия *A. deanei* в регионах Африки и Южной Америки позволило выделить 4 наиболее распространённые генотипические группы. Выделение базировалось на внутривидовом полиморфизме генов 18S рРНК и gGAPDH трипаносоматид, а также гене 16S рРНК эндосимбионта. Исследование показало отсутствие корреляции между разнообразием паразитов и географическими расстояниями, что согласуется с концепцией дизъюнктивного распространения, предложенного для данного вида. Основное различие связано с преобладанием определённых генотипов в разных группах хозяев: так, паразиты распространённых генотипических групп Dea1 и Dea3 преобладали в мухах родов *Lucilia* и *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) соответственно, что отражает явные предпочтения паразитов. Более редкие генотипы Dea2 и Dea4 в основном были обнаружены в кишечниках мух семейства Muscidae. Генотипы Dea1 и Dea3 имеют всемирное распространение, тогда как

генотипы Dea2 были отмечены только в регионах Афротропиков, а Dea4 – в регионах неотропиков (Borghesan et al., 2018). Используемый нами генетический маркер 18S рНК не позволяет добиться достоверного внутривидового разрешения в ходе филогенетического анализа. Тем не менее, мы показали, что этот изолят кластеризуется с ранее выделенными внутривидовыми генотипическими группами паразита Dea1-Dea3. С большей долей вероятности можно говорить о том, что изолят *A. deanei* MN наиболее близок к паразитам группы Dea1, так как был выделен из мухи *Lucilia sp.*

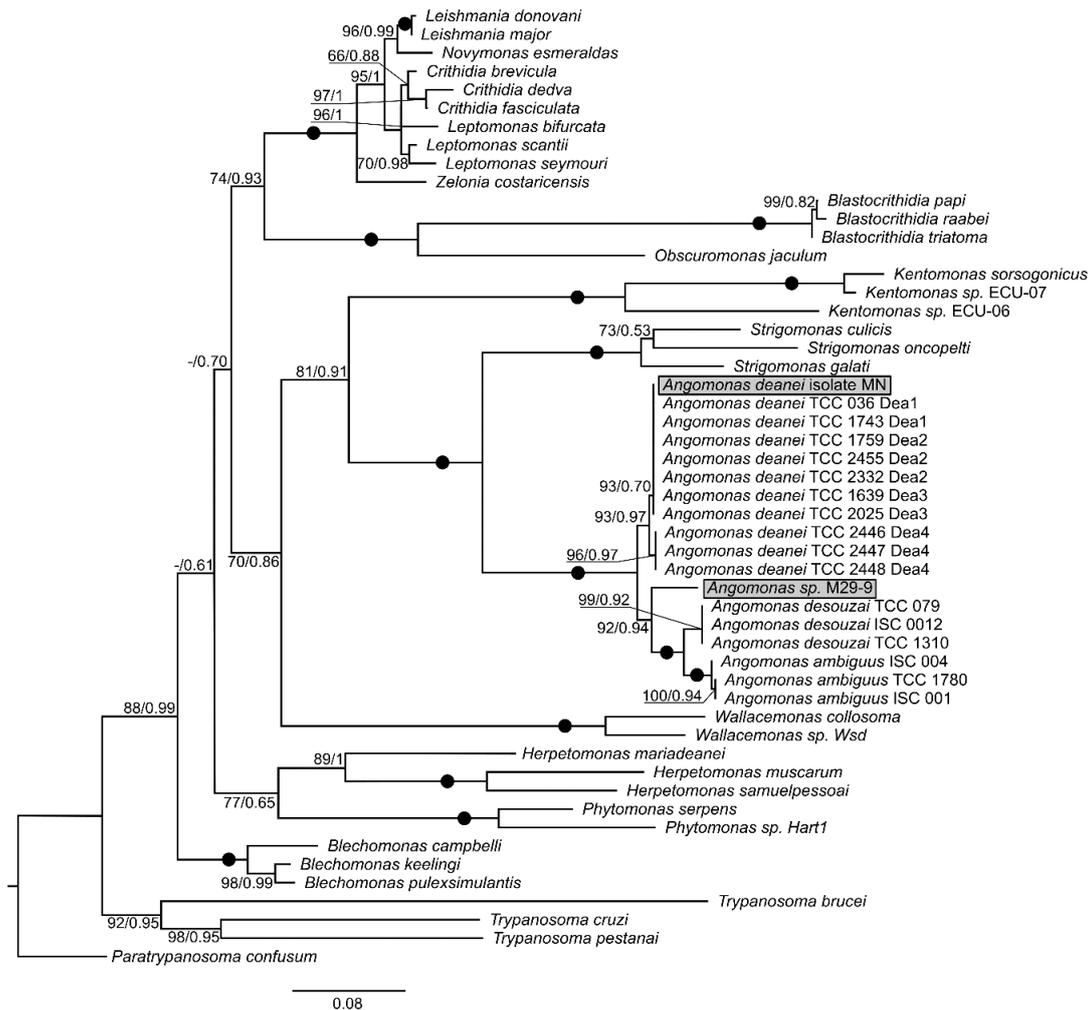


Рисунок 3.7. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рНК (построено с использованием модели TIM2e+I+G4). Значения в узлах соответствуют процентам бутстреп-поддержки и апостериорным вероятностям соответственно (узлы со значениями 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.

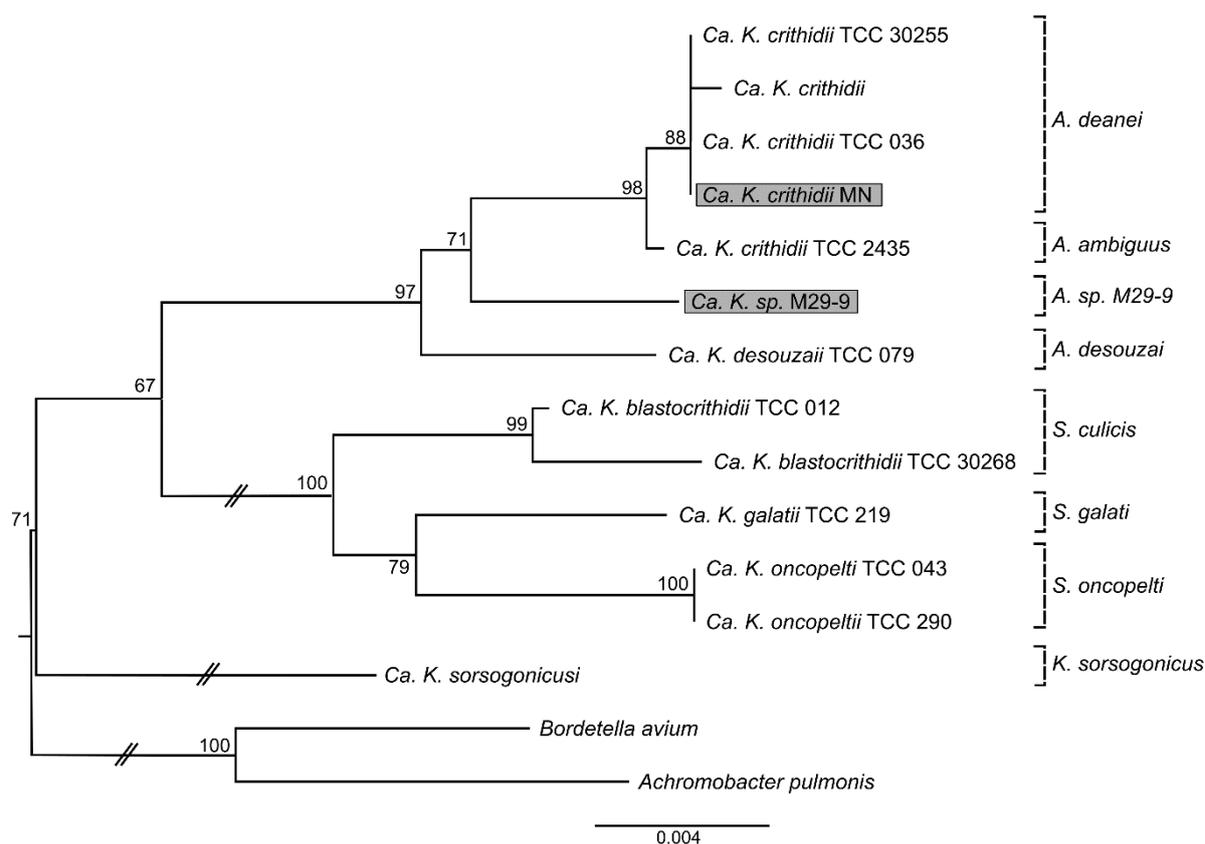


Рисунок 3.8. Филогенетическое дерево, реконструированное методом присоединения соседей по последовательностям бактериального гена 16S рРНК. Значения в узлах соответствуют значениям бутстреп-поддержки (50000 повторов). Исследуемые изоляты выделены. Масштабная линейка показывает количество замен на нуклеотид.

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

Всесветное распространение этого жгутиконосца может быть следствием широкого распространения его хозяев. Изоляты, выделенные нами, были получены из мух семейства Calliphoridae, среди которых виды-космополиты не являются редкостью. К примеру, *L. sericata* является всесветно распространённой мухой (Pont, 1980), а ареал *P. terraenovae* охватывает всю голарктическую область (Smith, 1986). В этом случае распространение паразита вслед за хозяином-космополитом может оказаться крайне успешной стратегией (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

В целом полученные нами данные по морфологии и организации клеток *A. deanei* MN из лабораторной культуры соответствуют имеющимся в литературе сведениям (Freymuller, Camargo, 1981; Motta et al., 1997; de Sousa, Motta, 1999; Gadelha et al., 2005; Motta et al., 2010; Teixeira et al., 2011). Подробно морфологические особенности *A. deanei* будут обсуждаться далее.

3.1.4 *Angomonas sp.* M29-9

Результаты

Этот вид был обнаружен в кишечнике мухи *Calliopus elisae* (Diptera: Lauxaniidae), пойманной в окрестностях дер. Ляды, Псковской области. Трипаносоматиды были выделены в аксеничную культуру, однако секвенирование фрагмента гена 18S рРНК показало присутствие нескольких видов трипаносоматид. В дальнейшем нам удалось разделить их путём клонирования на жидкой среде. Мы провели амплификацию бактериального гена 16S рРНК и получили положительный сигнал в одной из двадцати проанализированных клональных культур (M29 clone 9, в дальнейшем обозначенной M29-9). Анализ гена 18S рРНК трипаносоматид показал, что жгутиконосцы этой клональной культуры относятся к новому виду в пределах рода *Angomonas* (Zolotarev et al., 2018), в то время как остальные клональные культуры относятся к апосимбионтным трипаносоматидам *Leptomonas sp.* strain Cfm.

Морфология в культуре

В культуре клетки *Angomonas sp.* M29-9 представлены 3 основными морфотипами, которые были охарактеризованы выше для *A. deanei*: крупными промастиготами (рис. 3.9 Г, И), пармастиготами (рис. 3.9 А-В, Д, З), и опистомастиготами (рис. 3.9 Е, Ж), имевшими наиболее мелкие размеры (таб. 3.3). В основном клетки имели вытянутую форму с плавно закруглённым концом, однако среди каждого из морфотипов встречались необычные клетки с расширенным задним концом, которые имели каплевидную форму (рис. 3.9 Г, Д), или форму сапожка с ассиметрично вытянутым задним краем клетки (рис. 3.9 Е).

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 (рис. 3.9 А, Б, Ж, З), симбионты гантелеобразной формы, находящиеся в процессе цитокинеза (рис. 3.9 И), и парные симбионты после деления (рис. 3.9 В, Ж).

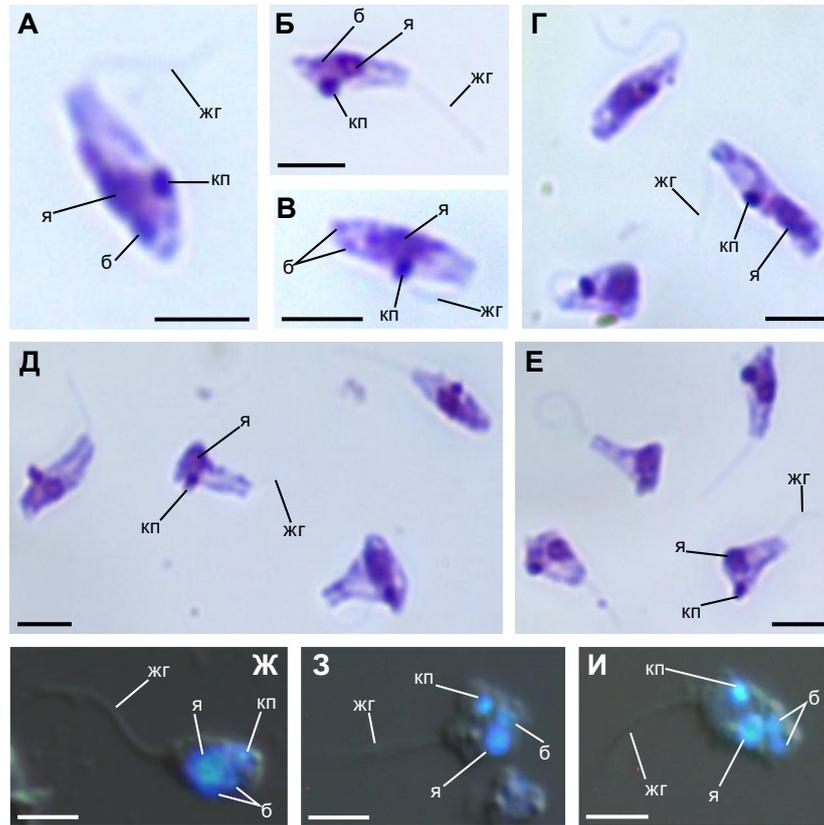


Рисунок 3.9. Морфология *Angomonas sp.* (M29-9) в лабораторной культуре. А-Е – препараты, окрашенные по Гимза-Романовскому, Ж-И – совмещенное фото DIC- и флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI). Масштабная линейка 10 мкм. Пояснения в тексте.

б – бактериальный симбионт, жг – жгутик, кп – кинетоласт, я – ядро

Таблица 3.3. Морфометрия *Angomonas sp.* M29-9 в культуре (N = 30).

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

Морфотип	Длина	Ширина	Ядро	Я-П	К-П	Длина жгутика
Промастиготы	6,12 ±1,18 (3,93-7,94)	2,02 ±0,64 (1,26-3,30)	1,71 ±0,34 (1,11-2,34)	3,24±0,74 (2,43-5,80)	2,03±0,95 (1,05-5,26)	5,34 ±2,10 (3,32-6,17)
Парамастиготы	5,29±0,99 (3,36-7,03)	2,01±0,64 (1,32-3,96)	1,53±0,30 (0,96-2,01)	2,63±0,49 (1,86-3,48)	2,89±0,55 (1,83-3,69)	3,77±1,48 (1,02-7,03)
Опистомастиготы	4,34±0,86 (2,76-6,46)	2,24±1,03 (1,20-5,29)	1,40±0,21 (1,02-1,74)	1,89±0,58 (0,99-3,45)	3,11±0,68 (1,59-4,38)	3,33±1,31 (1,41-6,43)

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ двух маркеров – гена 18S рРНК жгутиконосца и бактериального гена 16S рРНК 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* (рис. 3.7). Уровень различий в генетических последовательностях по маркеру 18S рРНК между новым видом *Angomonas sp.* M29-9/*A. deanei* и *Angomonas sp.* M29-9/*A. desouzai* составляет 2,3 и 2,4% соответственно.

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*) (рис. 3.8). Уровень генетических различий в последовательностях 16S рРНК между *Ca. Kinetoplastibacterium sp.* M29-9 и *Ca. K. crithidii*/*Ca. K. desouzaii* составил 1,2% для обоих случаев.

Обсуждение

Новый вид *Angomonas sp.* M29-9 был обнаружен в кишечнике мухи *Calliopyg 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 (Teixeira et al., 2011).

Филогенетическое положение как нового жгутиконосца, так и его симбионта, указывает на то, что его дивергенция 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 (Teixeira et al., 2011; Тўс et al., 2013; Borghesan et al., 2018). Считается, что возникновение и последующая эволюция трипаносоматид рода *Angomonas* связана с тропическими регионами – Афротропиками или Неотропиками, а всемирное распространение – следствие последующего активного расселения (Borghesan et al., 2018). 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.

Использование методов световой микроскопии показало, что *Angomonas sp.* M29-9 обладает всеми морфологическими особенностями жгутиконосцев рода *Angomonas*, которые можно выявить на этом уровне. Единственной необычной особенностью является присутствие в культуре клеток каплевидной формы, которые ранее не были отмечены для других видов ангомонасов.

3.1.5 *Phytomonas borealis*: первый симбионт-содержащий представитель подсемейство 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. (Ganyukova et al., 2020b).

За четырёхлетний период наблюдений нам удалось лишь однажды обнаружить заражённых клопов среди насекомых, собранных в Новгородской области (табл. 3.4). 5 из 16 (31%) вскрытых особей *P. bidens* содержали в своей средней кишке чрезвычайно длинных червеобразных промастигот, относящихся к роду *Phytomonas* (рис 3.10). 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 3.10 А, В), в другом это были промастиготы с иной морфологией, клетки которых отличались спиральной закрученностью (рис 3.10 С). Такие клетки заселяли как кишечник насекомого, так и его гемолимфу, а также слюнные железы (15-22%) (Ganyukova et al., 2020b). Последние в значительной степени напоминали трипаносоматид *Phytomonas nordicus*, который ранее был обнаружен в том же регионе (Frolov et al., 2016).

Таблица 3.4. 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)	—

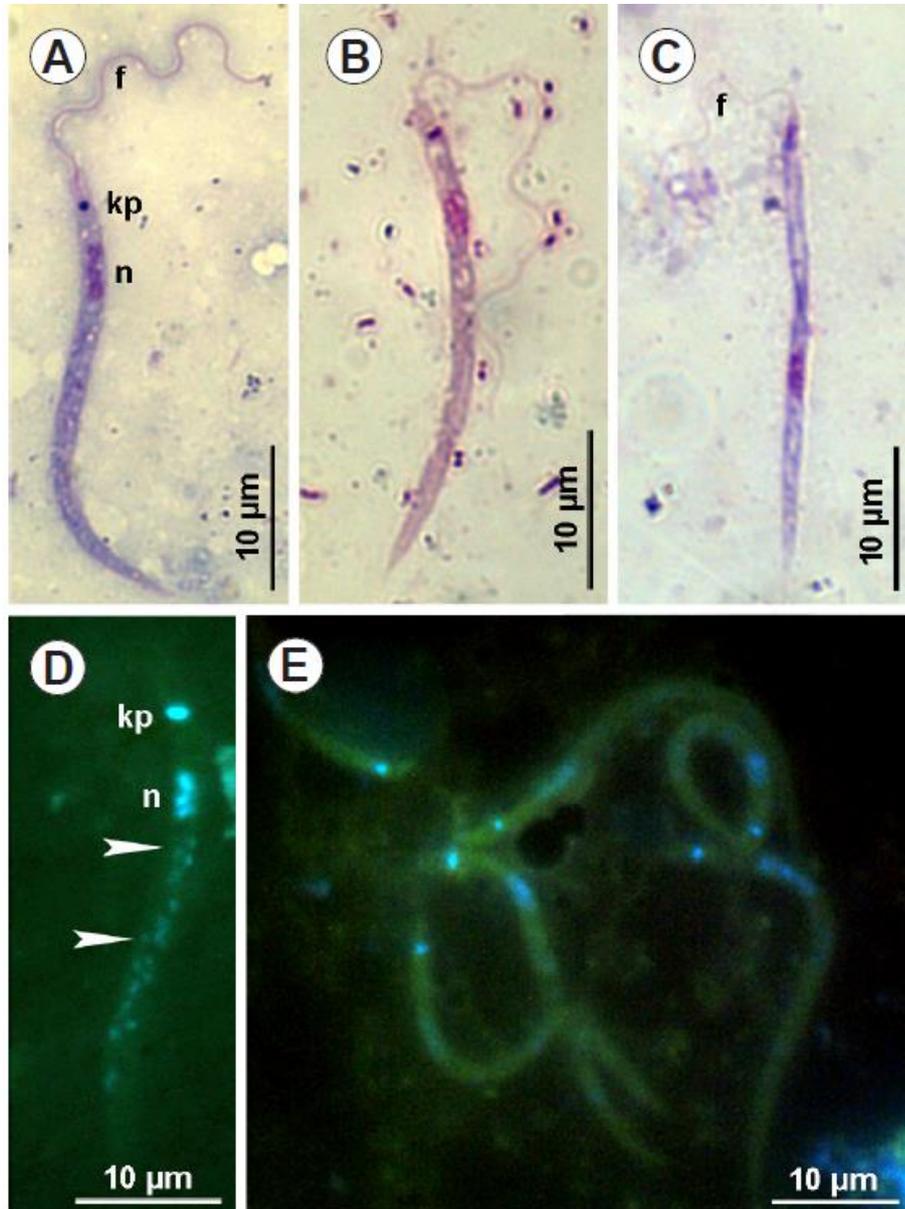


Рисунок 3.10. Промастиготы *Phytomonas* spp. из клопа *Picromerus bidens* (световая и флуоресцентная микроскопия). А, D – *P. borealis* sp. n. из Новгородской области; В, Е – *P. borealis* из Псковской области; С – *P. nordicus* Frolov et Malysheva, 1993 из Псковской области; А-С – окрашивание по Гимзе-Романовскому; D, Е - окрашивание DAPI.

f – жгутик; kp – кинетопласт; n – ядро; стрелками показаны прокариотические симбионты.

- Филогенетический анализ

Анализ последовательностей гена 18S рРНК 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 нуклеотидах между двумя последовательностями длиной 1781 нуклеотидов, 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 рРНК, подтвердили тесную связь этих двух видов с высокой достоверностью (рис. 3.11) (Ganyukova et al., 2020b). 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 M2. Тело промастигот длинное, червеобразное, лишено спиральной закрученности; размеры клеток в среднем составляли 35x1,3 мкм (таб. 3.5). 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 (Ganyukova et al., 2020b).

Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI выявило множество небольших (около 20) ДНК-содержащих бактериоподобных телец, расположенных преимущественно в постнуклеарной части клетки (рис. 3.10 D). Эти тела были обнаружены только у трипаносоматид из Новгородской области, в то время как у жгутиконосцев из второй локации эти структуры не наблюдались (рис. 3.10 E). Как правило, такие бактериоподобные тела имели шаровидную, либо реже палочковидную форму (Ganyukova et al., 2020b).

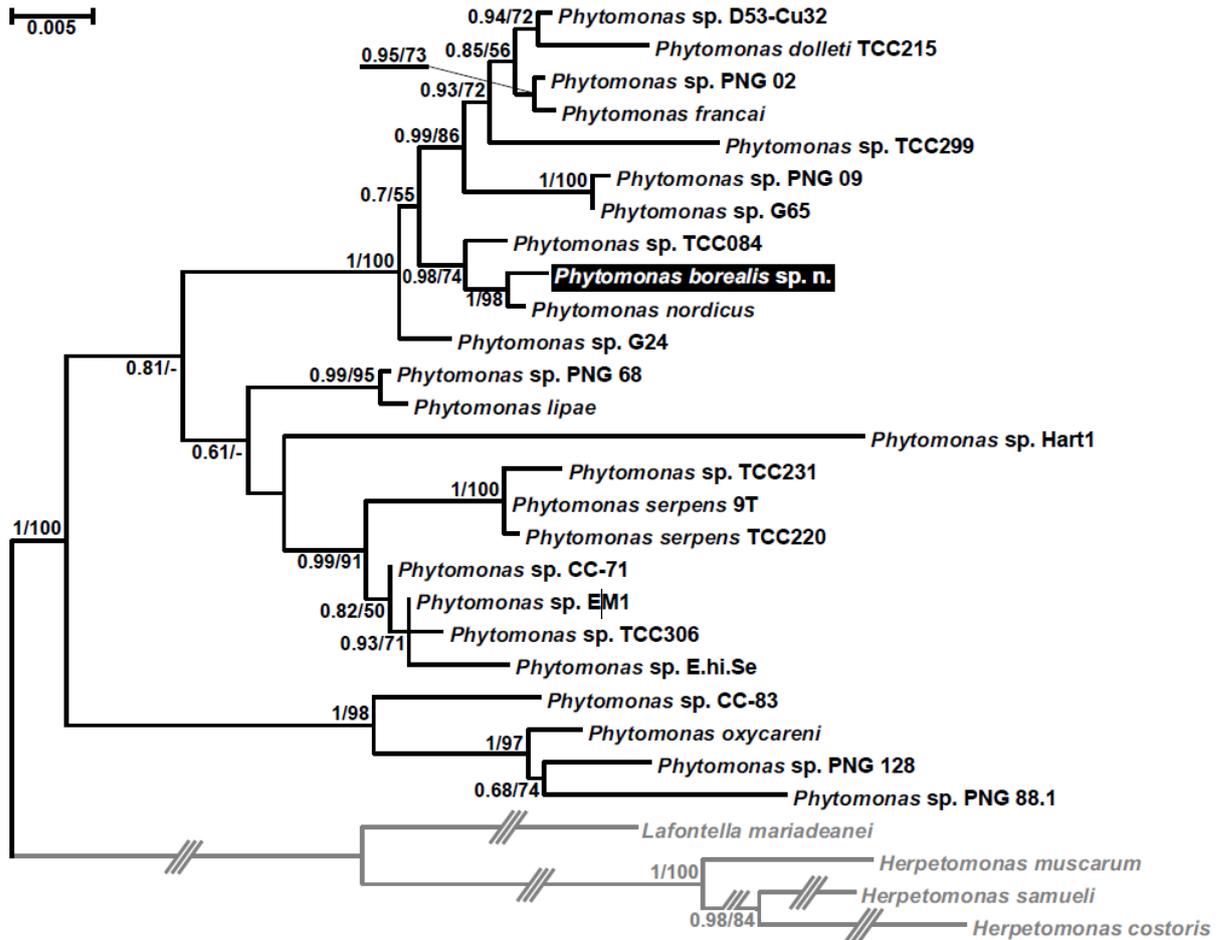


Рисунок 3.11. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия по последовательностям гена 18S рРНК. Значения в узлах соответствуют апостериорным вероятностям и процентам бутстреп-поддержки. Значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены прочерками. Ветви с тройным перечёркиванием сокращены на 1/3 от их первоначальной длины. Масштабная линейка показывает количество замен на нуклеотид. Исследуемый вид *Phytomonas borealis* sp. n. выделен.

Таблица 3.5. 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

2) Электронная микроскопия

Промастиготы *P. borealis* не образуют видимых контактов с клетками кишечного эпителия хозяина (рис. 3.12 А). Ультраструктура жгутиконосцев в целом типична для представителей рода *Phytomonas*: выраженная тубулемма с правильным корсетом микротрубочек, коротким, терминально расположенным жгутиковым карманом, ядром с пристеночным слоем хроматина и центральным ядрышком, а также компактный кинетопласт (рис. 3.12 В, С). Комплекс Гольджи располагается рядом с кинетопластом (рис. 3.12 В). Цитоплазма содержит многочисленные рибосомы, гликосомы, ацидокальцисомы и митохондриальные ветви (рис. 3.12 С).

Примечательной особенностью промастигот *P. borealis* стало присутствие бактериоподобных структур в цитоплазме (рис. 3.12 С – Г). 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 (Рис. 3.12 F, G). В бактериальных клетках не обнаружено ни периплазматического пространства, ни клеточной стенки (рис. 3.12 D, G) (Ganyukova et al., 2020b).

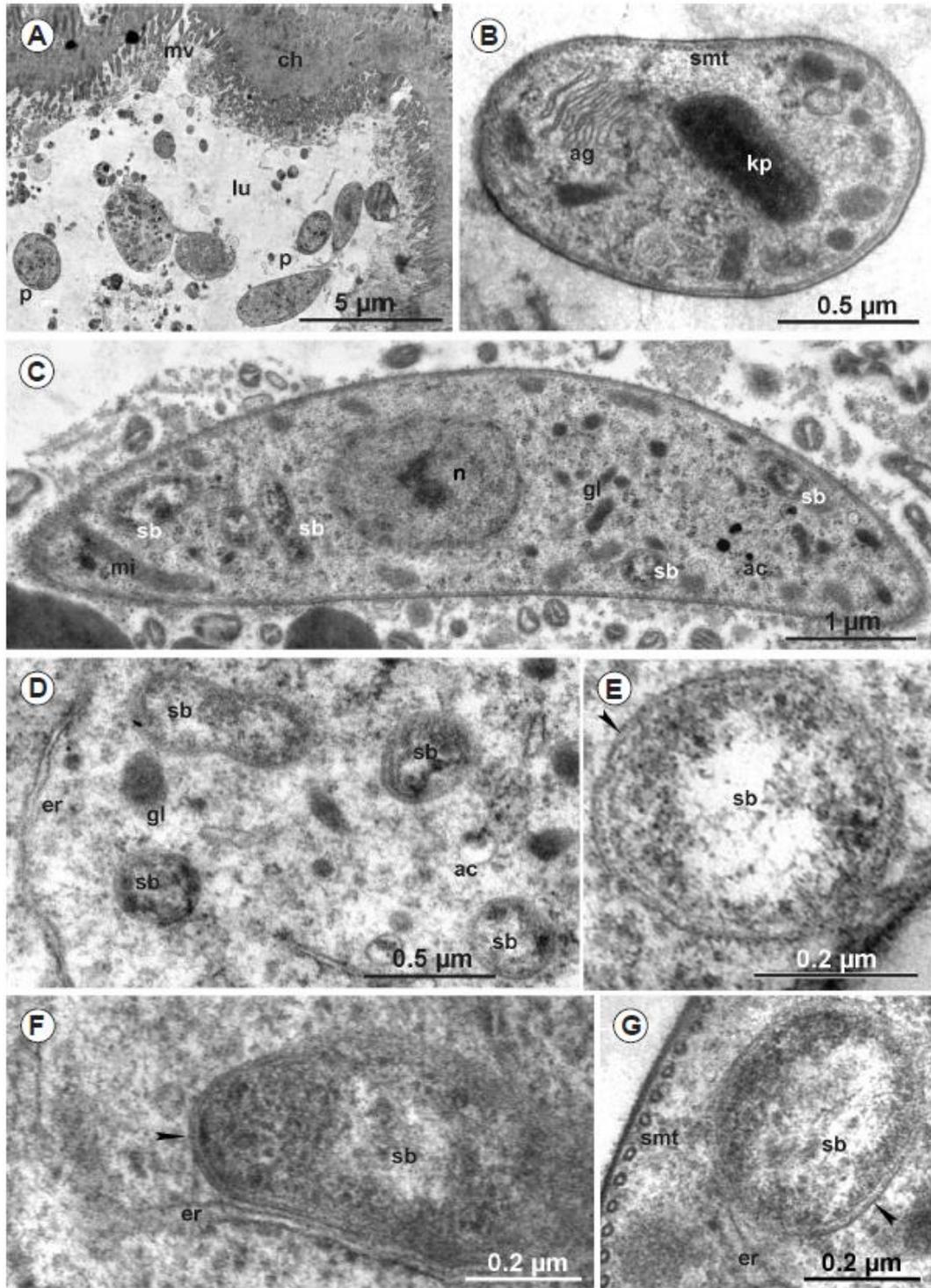


Рисунок 3.12. Промастиготы *Phytomonas borealis* sp. n. из *Picromerus bidens* (Linnaeus) (TEM). А – жгутиконосцы в просвете средней кишки; В – поперечный срез через клетку; С – продольный срез через клетку; D-G – прокариотические эндосимбионты в цитоплазме жгутиконосцев.

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.

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 унивольтинным 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 размножаться в течение последующего сезона (Ganyukova et al., 2020b).

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 неспецифическим 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, 2003; 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 (Ganyukova et al., 2020b).

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 (Ganyukova et al., 2020b).

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 и регуляция численности симбионтов со стороны жгутиконосца 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 эволюцию эндосимбиозов у трипаносоматид (Ganyukova et al., 2020b).

3.2 Жизненные циклы симбионт-содержащих трипаносоматид

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 *A. deanei* и *N. esmeraldas*, которые являются представителями двух основных, хорошо охарактеризованных ветвей симбионтсодержащих трипаносоматид.

3.2.1 *Novymonas esmeraldas*

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента по заражению двух видов мух – *Protophormia terrestris* и *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae)– паразитическим жгутиконосцем *Novymonas esmeraldas* (культура e262, любезно предоставленная А. Ю. Костыговым) нам не удалось получить стабильную инфекцию ни в одном из видов хозяев.

Вскрытие 10 имаго *P. terrestris* через 24 часа с момента заражения позволило выявить только мёртвые клетки в средней кишке насекомого. 20 особей, вскрытых через 6 дней с момента заражения, оказались незаражёнными.

Аналогичные результаты мы получили для *C. vicina*. Из 10 особей, вскрытых на первые сутки, все также оказались незаражёнными: в средней кишке 8 мух были обнаружены мёртвые неподвижные клетки, в то время как 2 мухи не содержали в кишке даже погибших клеток паразита. Также 20 особей на 6 день с начала эксперимента не были заражены.

Таблица 3.6. Однократное заражение имаго *Protophormia terrestris* и *Calliphora vicina*.

Хозяин	1 сутки	6 суток
<i>Protophormia terrestris</i>	Вскрыто: 10 Заражено: 0	Вскрыто: 20 Заражено: 0
<i>Calliphora vicina</i>	Вскрыто: 10 Заражено: 0	Вскрыто: 20 Заражено: 0

Считается, что симбионты путём выработки метаболитов способны повышать метаболический потенциал трипаносоматид и способствовать расширению круга их хозяев. Изначально *N. esmeraldas* был выделен из кишечника клопа *Niesthrea vincentii* (изолят, с которым мы работали), но позднее так же был обнаружен в кишечнике клопов *Chaetodus rutilans*

и *Lasiomiris albopilosus* (Hemiptera, Miridae) в Папуа Новая Гвинея (Králová et al., 2018), и в мухе цеце *Glossina fuscipes* (Diptera: Glossinidae) в Центральноафриканской Республике (Votupka et al., 2021). Косвенно эти данные указывают на потенциально широкий круг хозяев *N. esmeraldas*, однако наши попытки заразить насекомых оказались неудачными. Вероятно, *N. esmeraldas* является видом с узкой гостальной специфичностью, а его обнаружение в широком круге различных хозяев – следствие неспецифических и, по всей видимости, кратковременных инвазий.

3.2.2 *Angomonas deanei*: морфология и жизненный цикл

Результаты

Мы поставили серию экспериментов по моделированию жизненного цикла *A. deanei*, а также способов передачи, и оценке гостальной специфичности этого паразита.

Жизненный цикл *Angomonas deanei* 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. 3.13 А. Передняя кишка включает глотку, озофагус, от которого отходит канал, ведущий в крупный слепозамкнутый пищевой резервуар (не указаны на 3.13 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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

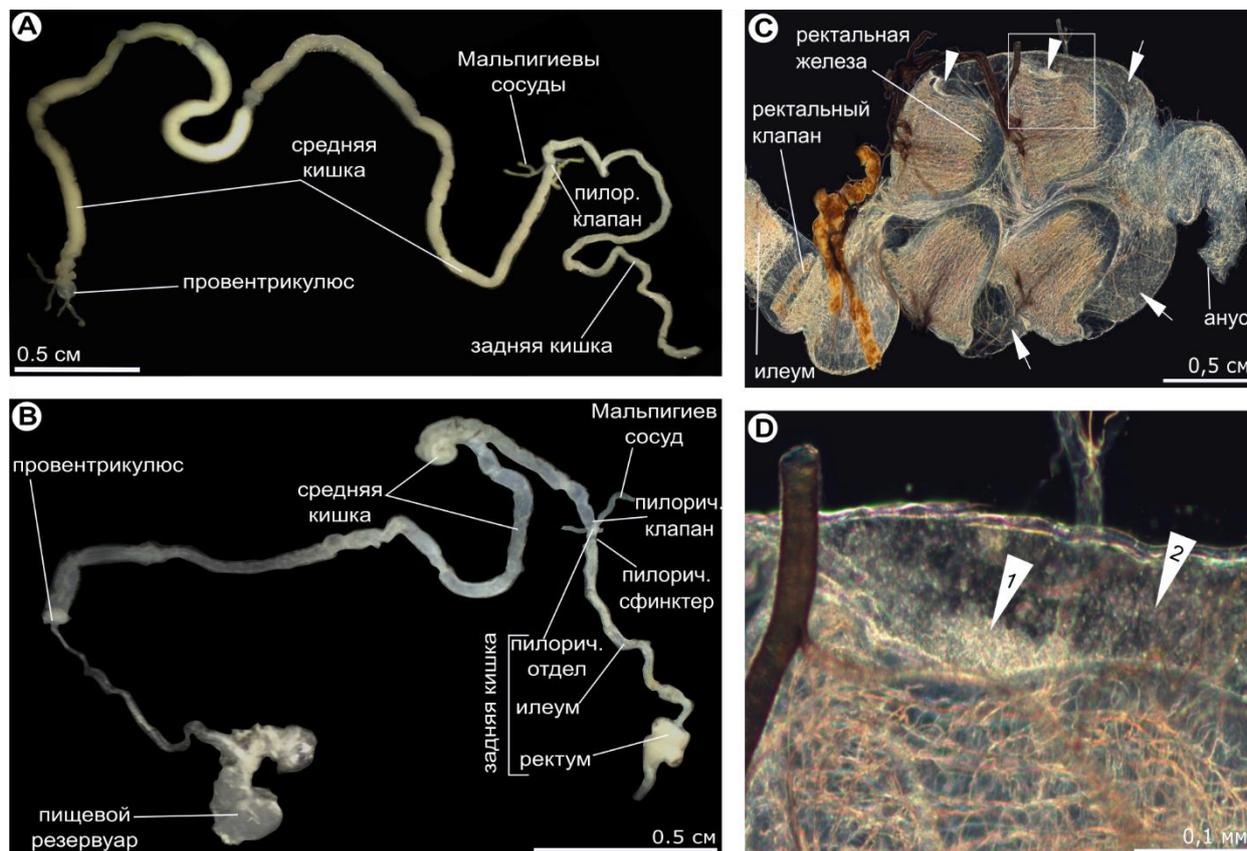


Рисунок 3.13. А – пищеварительный тракт личинки *Lucilia sericata*. В – пищеварительный тракт имаго *L. sericata*. С-D – ректум инфицированного имаго *L. sericata*. Стрелка 1 указывает скопления прикрепленных трипаносоматид; стрелка 2 указывает на скопления свободно плавающих трипаносоматид.

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, 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. 3.7). У всех особей в просвете передней кишки и передних отделах средней кишки присутствовали свободно плавающие клетки *A. deanei* (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

Таблица 3.7. 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 сутки	% (18/зар 7)	40% (10/зар 4)	Средняя кишка, задняя кишка (несколько клеток)
3 сутки	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.

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. 3.8). 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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

Таблица 3.8. 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)

Эксперимент 3. Влияние инфекции на жизнеспособность и развитие личинок

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 неконтотминированной говяжьей печени (контрольная группа). На 8 сутки произошла пупаризация насекомых. Мы отмечали 30 пупариев в случае инфицированных личинок и 31 пупарий в случае контрольной группы.

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 инфекции ни в одном из взрослых насекомых (таб. 3.9) (Ganyukova et al., 2020a).

Таблица 3.9. 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
Вылетевшие имаго (12-14 суток)	29	28
Заражённые имаго	0	0

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

Пищеварительная система имаго *L. sericata* и *C. vicina* имеет типичную для большинства брахицер организацию (рис. 3.13 В, С). Передняя кишка представлена глоткой (не указана на рис. 3.13), коротким озофагусом, от задней части которого отходит длинный канал, ведущий в

крупный слепозамкнутый пищевой резервуар. Провентрикулос 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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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 15 мкл, содержащая *A. deanei* MN. Затем мух вскрывали через определённые временные промежутки (таб. 3.10).

Таблица 3.10. 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)

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 провентрикулос, а также передним отделам средней кишки. Однако уже через 1 час жгутиконосцы оккупировали весь пищеварительный тракт, включая отделы задней кишки (илеум и ректум) (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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. 3.10 С, D). Судя по всему, закрепляясь в ректуме, клетки *A. deanei* в дальнейшем не выходят за его пределы, активно размножаясь в этом отделе (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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. 3.14 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. 3.14 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) (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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 незаражённых 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%) (Ganyukova et al., 2021).

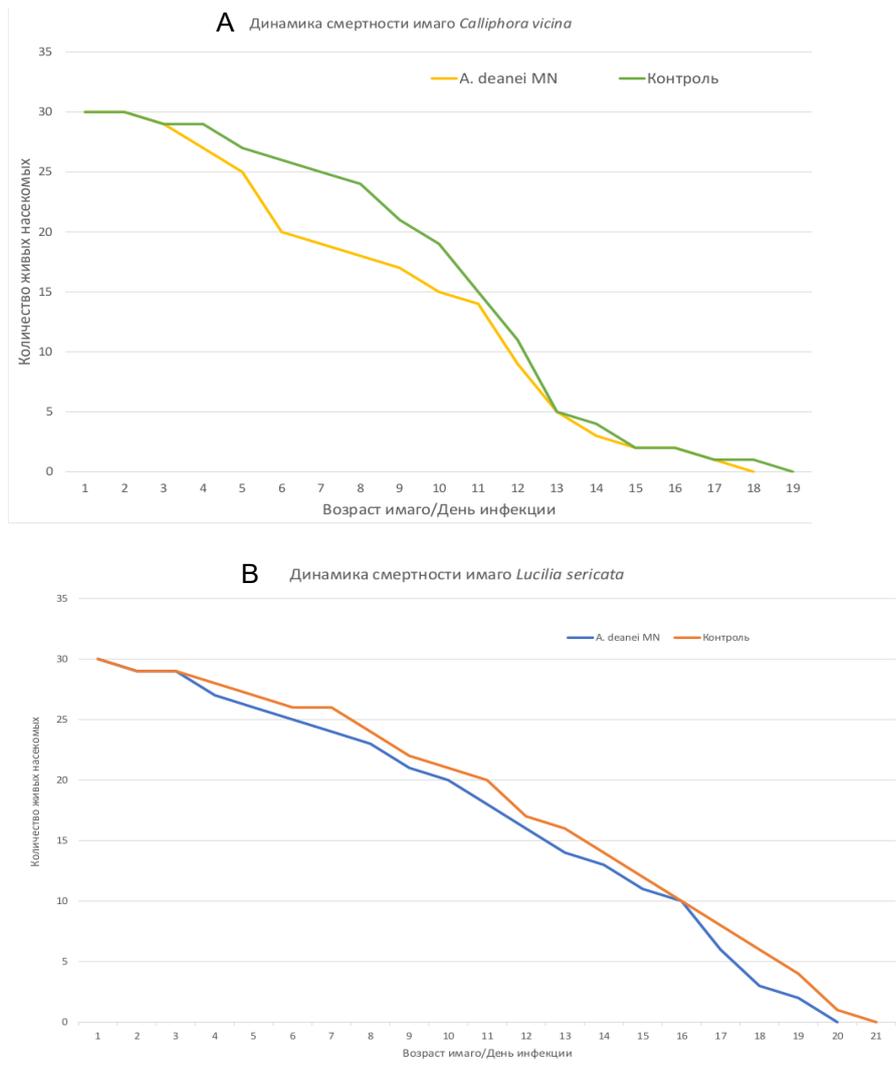


Рисунок 3.14. Динамика смертности имаго в условиях иммобилизации.

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. 3.11, 3.12). 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* (Ganyukova et al., 2021).

Таблица 3.11. 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%)	

Таблица 3.12. 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. 3.13, С, D; рис. 3.15 А, Е, F). Трипаносоматиды распределены неравномерно: наибольшие скопления прикреплённых клеток располагаются на поверхности ректальных желёз. Часть клеток прикрепляется к кутикуле ректального эпителия. Свободные жгутиконосцы в массе плавают в просвете ректума и прямой кишки (Ganyukova et al., 2020a).

В ректуме хозяина клетки *A. deanei* прикрепляются жгутиками к поверхности кутикулярной выстилки (рис. 3.15, А-F, Н-L). Структура кутикулы ректума в местах прикрепления (рис. 3.15 Н-L) не изменена в сравнении с участками, свободными от паразитов (рис. 3.15 G). Прикрепление паразитов к поверхности ректума осуществляется кончиком жгутика или его латеральной поверхностью, и сопровождается формированием полудесмосом (рис. 3.15 В, D, F) (Ganyukova et al., 2020a).

В кишечнике хозяина клетки имеют небольшие размеры (таб. 3.13). Основываясь на положении кинетопласта в клетке, мы выделили три морфотипа, которые встречаются в кишечнике хозяина: промастиготы, парамастиготы и опистомастиготы (рис. 3.16), которые соответствуют формам, описанным из культуры. Наибольший процент – 80,8 %, составляют округлые парамастиготы (рис. 3.16 В). Доля удлинённых промастигот составляла 10,8 % (рис. 3.16 А). Наиболее редкий тип – опистомастиготы, встречались с частотой 8,4 % (рис. 3.16 С). Жгутиковые карманы клеток всех морфотипов широкие, хорошо выражены (Ganyukova et al., 2020a).

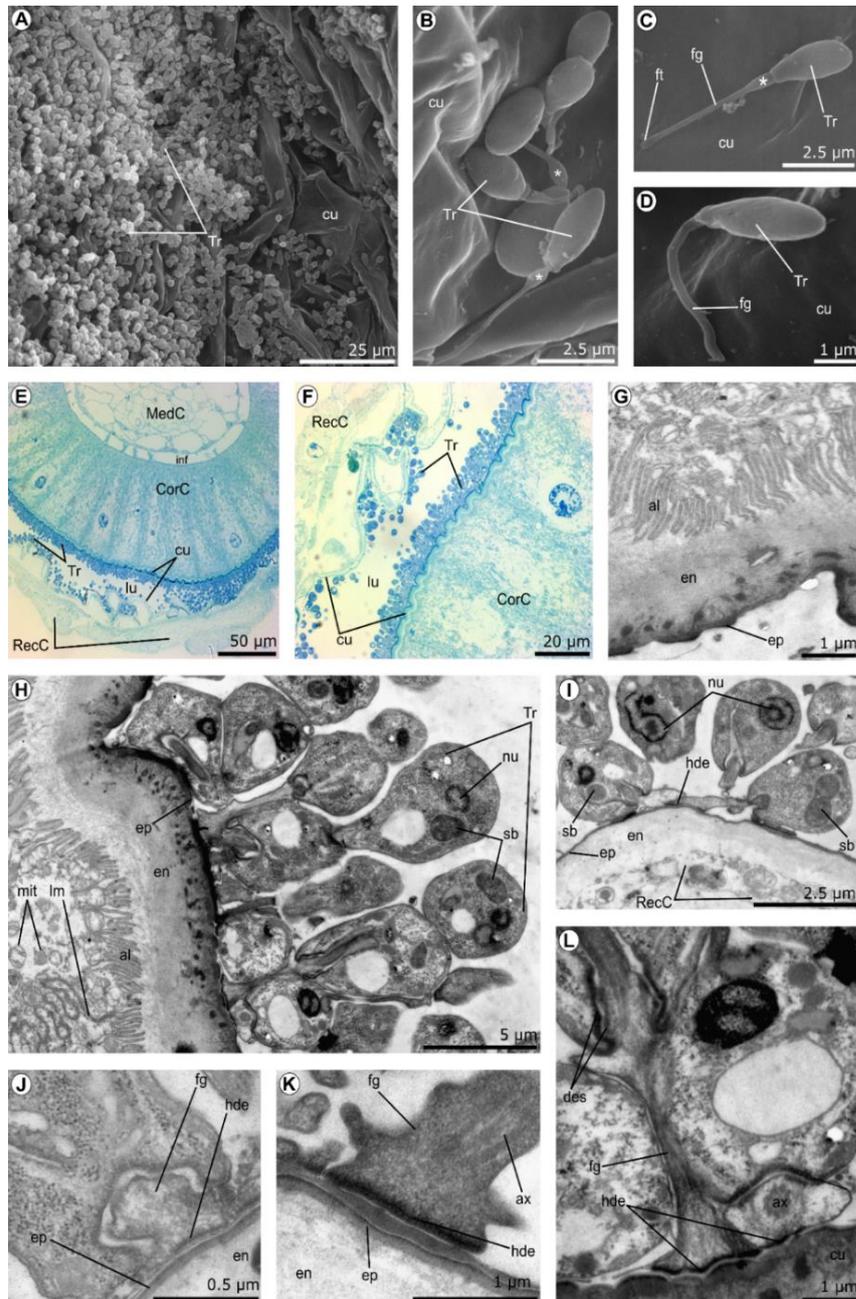


Рисунок 3.15. Заражение *A. deanei* MN в ректуме *L. sericata*. A-D – СЭМ-микрофотографии клеток *A. deanei*, прикрепленных к кутикуле прямой кишки хозяина. Расширенные основания жгутиков отмечены звездочками; E-F – фрагмент поперечного полутонкого среза инфицированного ректума в области ректальной железы (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 эпикутикеле (ТЭМ).

al – апикальные ламеллы; ax – аксонема; CorC – клетки кортикального эпителия; cu – кутикула ректума; des – десмосомоподобные контакты; en – эндокутикула; ep – эпикутикела; fg – жгутик; ft – кончик жгутика; hde – десмосомо-подобные контакты; inf – инфундибулум; 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.

Таблица 3.13. 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)

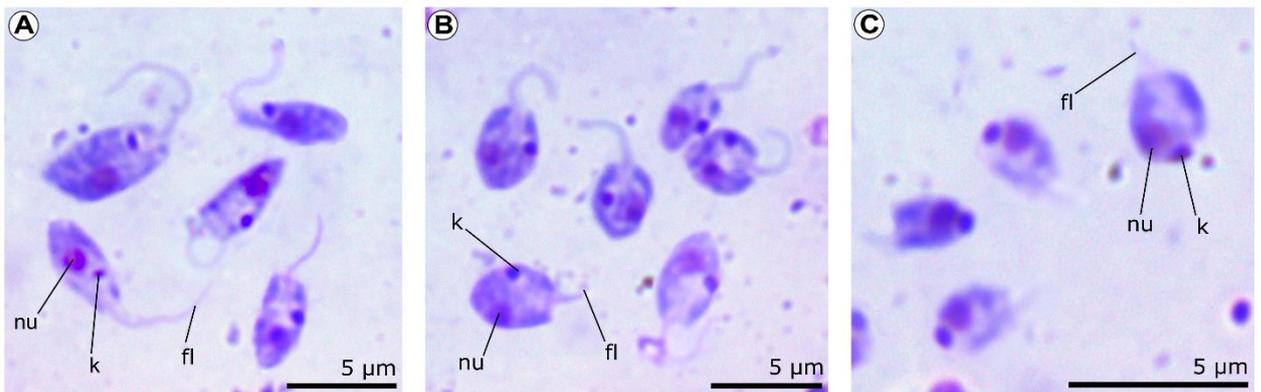


Рисунок 3.16. Разнообразие морфотипов *A. deanei* в ректуме *L. sericata* А – промастиготы; В – парамастиготы; С – опистомастиготы.

к – кинетопласт; с – эндосимбионт; я – ядро.

Ультратонкая организация клеток *A. deanei* в кишечнике хозяина не отличается от таковой для клеток в культуре. Жгутиконосцы несут характерные для подсемейства Strigomonadinae признаки: крупный рыхлый кинетопласт (рис. 3.17 А, В), цитоплазматических бактериальных симбионтов в симбионтофорных вакуолях (рис. 3.17 Н, I; рис. 3.17 А-С, F, Н), нерегулярно расположенные микротрубочки тубулеммы, которые перемежаются ветвями митохондрия (рис. 3.17 F). Параксиальный тяж отсутствует, за исключением расширенного основания жгутика, где можно отметить эту структуру в редуцированном виде (рис. 3.17 D-E).

Так же мы отмечали контрактильную вакуоль, которая посредством длинного канала связана со жгутиковым карманом (рис. 3.17 G) (Ganyukova et al., 2020a).

Клетки *A. deanei* характеризуются наличием цитостома (рис. 3.17 H-I). 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 (Ganyukova et al., 2020a).

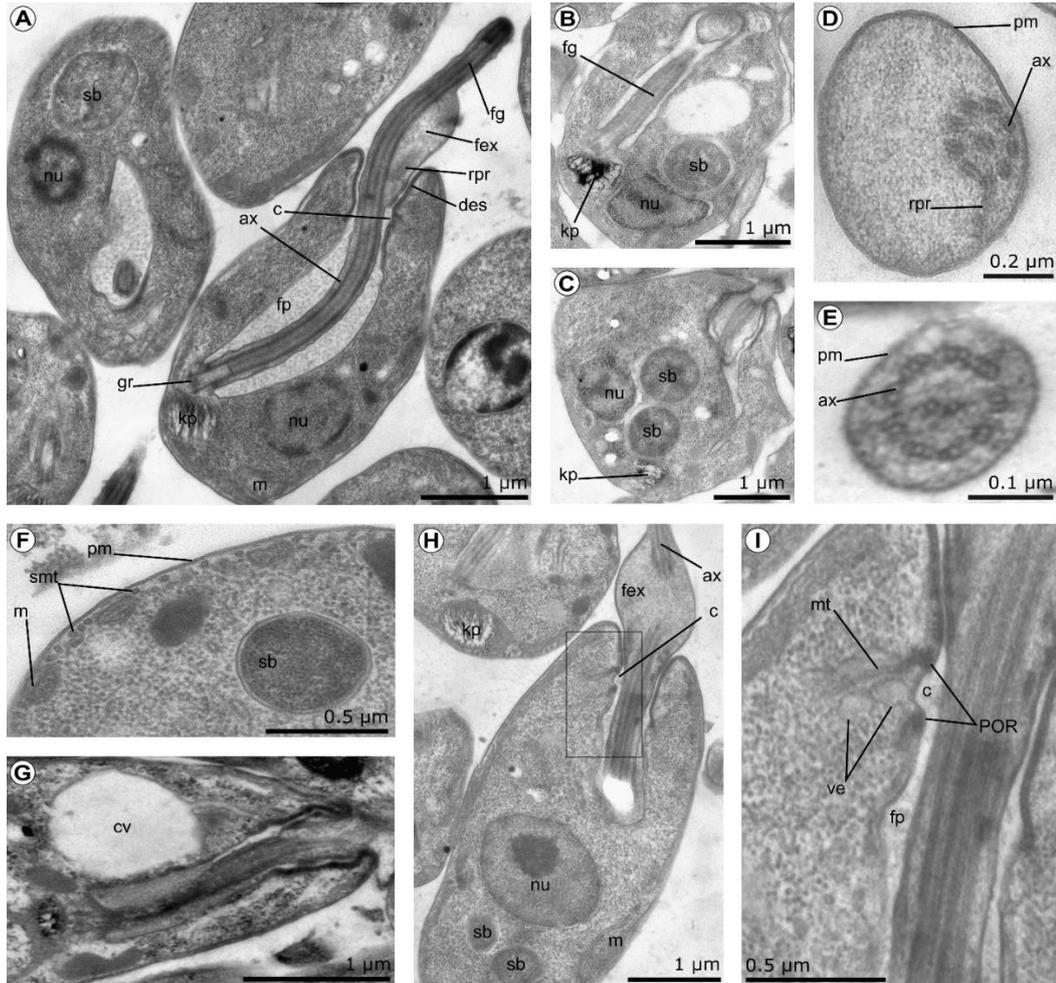


Рисунок 3.17. Ультраструктура *A. deanei* MN в ректуме *L. sericata* (ТЭМ). А-С – продольный срез клетки; D – поперечный срез через основание жгутика; E – поперечный срез через дистальную часть жгутика; F – поперечный срез клетки; G – сократительная вакуоль; H – поперечный срез в области жгутикового кармана и цитостома; I – цитостом *A. deanei* (увеличенный сегмент H).

ax – аксонема; c – цитостом; cv – сократительная вакуоль; des – десмосомоподобные контакты; fex – расширенная часть жгутика; fg – жгутик; fp – жгутиковый карман; gr – гранула; kp – кинетопласт; m – митохондрион; mt – микротрубочки; nu – ядро; pm – плазматическая мембрана; POR – преоральный валик; rgr – редуцированный парафлагеллярный тяж; sb – бактериальный симбионт; smt – субпелликулярные микротрубочки; ve – везикулы.

Обсуждение

Одна из особенностей *Angomonas deanei*, определяющая интерес исследователей, – это его необычайно широкая гостальная специфичность. В предыдущих разделах мы уже указывали регионы и круг хозяев, в которых он был обнаружен. 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 (Carvalho, 1974), и могут заражаться трипаносоматидами из двукрылых в процессе поедания своих жертв (Carvalho, 1974). 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 (Ганюкова и др., 2017; Ганюкова, Золотарёв, 2018; Zolotarev et al., 2019) 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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021). 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. samuelpessoai*, который предпочитает прикрепляться к кутикулярной выстилке в основаниях ректальных желёз, но не на них самих (Hopperich 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), и по всей видимости имеют создают особые условия для пролиферации жгутиконосцев.

Прикрепление к кутикуле хозяина осуществляется при помощи жгутика, причём в месте прикрепления со стороны жгутика формируются контакты полудесмосомального типа (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021). 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; de Sousa, Motta, 1999; 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, Карпов, 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 (Bombaça et al., 2017; Loyola-Machado et al., 2017), и его существование ставилось под сомнение (Harmer et al., 2018). 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 (Ganyukova et al., 2020a).

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 (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021).

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 (Shaub, 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* (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021). Имаго калифорид 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 калифорид, 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 калифорид: *C. vicina*, *L. sericata* и *P. terraenocae* (Ganyukova et al., 2020a; Ganyukova et al., 2021). 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 калифориды 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 отряда Hemiptera. Такая ситуация не является уникальной: среди трипаносоматид нередки случаи, когда отдельный вид жгутиконосца был отмечен в насекомых из различных отрядов. *Herpetomonas samuelpeessoai* 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 многие виды клопов, 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, а также различных двукрылых: комаров *Culex* spp. и мухи семейств Calliphoridae, Muscidae, Heleomyzidae, Sepsidae и Antomyidae (Schoener et al., 2018).

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 жёлтом теле – скоплении клеток личиночной кишки (Hamilton et al., 2015). Так же отмечено, что двужгутиковая трипаносоматида, описанная как «*H. muscarum*», способна оккупировать среднюю кишку личинок *Hipellates pusio* (Bailey, Brooks, 1972a, b). В дальнейшем они пенетрируют стенку кишки и проникают в гемоцель хозяина. Часть таких личинок с заражением в гемоцели гибнет, однако часть претерпевает метамоорфоз 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 (Ну, 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 (Ganyukova et al., 2020a).

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 и 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 тубулема, 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:

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

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.

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.

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.

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:

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

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 // 49th Jírovec's Protozoological Days Conference Proceedings. – Czech Republic, Prague, 2019. – P. 21

Zolotarev, A. Trypanosomatids diversity is Northern Eurasia: who lives in taiga and tundra? / A. Zolotarev, M. Malysheva, A. Kostygov, A. Frolov, **A. Ganyukova** // 49th Jírovec's Protozoological Days Conference Proceedings. – Czech Republic, Prague, 2019. – P. 21

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.

Список литературы

1. Артамонов, С. Д. Особенности экологии каллифорид (Diptera: Calliphoridae) Дальнего Востока России / С. Д. Артамонов // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. – 2011. – №. 22. – С. 159–166.
2. Виноградова, Е. Б. Диапауза мух и ее регуляция / Е. Б. Виноградова // Труды Зоологического института АН СССР. – 1991. – Т. 214. – С. 255.
3. Зайцева, Г. Н. Действие хлорамфеникола и циклогексимида на синтез белка в биполярном теле (эндосимбионте) клетки *Strigomonas oncopelti* / Г. Н. Зайцева, Т. А. Салихов // Известия Академии Наук СССР (сер. биологическая). – 1973. – С. 252–259.
4. Калининкова, В. Д. Иммунохимическое исследование биполярных тел жгутикового простейшего *Crithidia oncopelti* / В. Д. Калининкова, Н. Г. Федцова, В. В. Асеев, А. Т. Ширшов, Г. Н. Зайцева // Цитология. – 1974. – Т. 16. – №. 11. – С. 1377–1381.
5. Кострикина, Н.А. Электронно–микроскопическое и биохимическое изучение биполярных тел клетки *Crithidia oncopelti* / Н. А. Кострикина, В. И. Бирюзова, Т. А. Салихов, Г. Н. Зайцева // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1974. – № 5. – С. 750–754.
6. Костыгов, А. Ю. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock, 1914: лептомонас или бластокритидия / А. Ю. Костыгов, А. О. Фролов // Паразитология. – 2007. – Т. 41. – №. 2. – С. 126–136.
7. Малышева, М. Н. Описание и лабораторное культивирование *Leptomonas repentinus* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)—паразита клопа–водомерки *Gerris rufoscutellatus* / М. Н. Малышева, А. О. Фролов // Паразитология. – 2002. – Т. 36. – №. 4. – С. 286–294.
8. Малышева, М. Н. Цикл развития жгутиконосца *Proteomonas brevicula* (Trypanosomatidae) в хищных клопах семейства Nabidae (Hemiptera) / М. Н. Малышева, А. О. Фролов // Паразитология. – 1995. – Т. 29. – №. 4. – С. 289–297.
9. Подлипаев, С. А. Специфичность гомоксенных трипаносоматид / С. А. Подлипаев // Паразитология. – 2003. – Т. 37. – №. 1. – С. 3–17.
10. Подлипаев, С. А. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) / С. А. Подлипаев, А. О. Фролов // Паразитология. – 1987. – Т. 21. – №. 4. – С. 545–552.
11. Подлипаев, С. А. Каталог мировой фауны простейших семейства Trypanosomatidae (Protozoa) / С. А. Подлипаев // Труды ЗИН РАН. — 1990. — Т. 217. —177 С.
12. Фролов, А. О. Описание *Phytomonas nordicus* n. sp. (Trypanosomatidae) из хищного клопа *Troilus luridus* (Hemiptera: Pentatomidae) / А. О. Фролов, М. Н. Малышева // Паразитология. – 1993. – Т. 27. – №. 3. – С. 227–232.

13. Фролов, А. О. Трансформации жизненных циклов в эволюционной истории трипаносоматид. Эндотрансформации и aberrации / А. О. Фролов, М. Н. Малышева, А. Ю. Костыгов // *Паразитология*. – 2016. – Т. 50. – №. 2. – С. 97–113.
14. Фролов, А. О. Необычный способ формирования инвазионных стадий у *Leptomonas rigidus* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) / А. О. Фролов, С. А. Подлипаев // *Паразитология*. – 1996. – Т. 30. – №. 6. – С. 473–477.
15. Фролов, А. О. Класс Kinetoplastidea Honigberg, 1963 / А. О. Фролов // В кн.: *Протисты*. — Ч. 1. — СПб: Наука, 2000. — С. 211—256.
16. Фролов, А. О. Происхождение трипаносоматид / А. О. Фролов // *Паразитология*. — 1993. — Т. 27. — № 2. — С. 97—107.
17. Alfieri, S. C. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts / S. C. Alfieri, E. P. Camargo // *Experimental parasitology*. – 1982. – Vol. 53. – №. 3. – P. 371–380.
18. Alves, J. M. P. Genome evolution and phylogenomic analysis of *Candidatus Kinetoplastibacterium*, the betaproteobacterial endosymbionts of *Strigomonas* and *Angomonas* / M. G. Serrano, F. Maia da Silva, L. J. Voegtly, A. V. Matveyev, M. M. Teixeira, G. A. Buck // *Genome biology and evolution*. – 2013 a. – Vol. 5. – №. 2. – P. 338–350.
19. Alves, J. M. P. Endosymbiosis in trypanosomatids: the genomic cooperation between bacterium and host in the synthesis of essential amino acids is heavily influenced by multiple horizontal gene transfers / C. C. Klein, F. M. da Silva, A. G. Costa–Martins, M. G. Serrano, G. A. Buck, ... E. P. Camargo // *BMC evolutionary biology*. – 2013 b. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1–20.
20. Alves, J. M. P. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts / L. Voegtly, A. V. Matveyev, A. M. Lara, F. M. da Silva, M. G. Serrano, E. P. Camargo, E. P // *PLoS one*. – 2011. – Vol. 6. – №. 8. – С. e23518.
21. Alves, J. M. P. Working together: amino acid biosynthesis in endosymbiont–harbouring trypanosomatidae / J. M. P. Alves, J. P. F. D’Mello // *The Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids*. Wallingford, UK Boston, USA: CAB International. – 2017. – P. 371–383.
22. Azevedo–Martins, A. C. Mitochondrial respiration and genomic analysis provide insight into the influence of the symbiotic bacterium on host trypanosomatid oxygen consumption / A. C. Azevedo–Martins, A. C. L. Machado, C. C. Klein, L. Ciapina, L. Gonzaga, A. T. R. Vasconcelos, M. C. M. Motta // *Parasitology*. – 2015. – Vol. 142. – №. 2. – P. 352–362.
23. Bailey, C. H. Histological observations on larvae of the eye gnat, *Hippelates pusio* (diptera: Chloropidae), infected with the flagellate *Herpetomonas muscarum* / C. H. Bailey, W. M. Brooks // *Journal of invertebrate pathology*. – 1972a. – Vol. 19. – №. 3. – P. 342–353.

24. Bailey, C. H. Effects of *Herpetomonas muscarum* on development and longevity of the eye gnat, *Hippelates pusio* (Diptera: Chloropidae) / C. H. Bailey, W. M. Brooks // Journal of invertebrate pathology. – 1972b. – Vol. 20. – №. 1. – P. 31–36.
25. Barreto-de-Souza, V. HIV–1 infection and HIV–1 Tat protein permit the survival and replication of a non–pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF– β 1 production / V. Barreto-de-Souza, T. X. Medeiros, M. C. M. Motta, D. C. Bou–Habib, E. M. Saraiva, E. M // Microbes and infection. – 2008. – Vol. 10. – №. 6. – P. 642–649.
26. Becker, E. R. Observations on the morphology and life history of *Herpetomonas muscae–domesticae* in North American muscoid flies / E. R. Becker // The Journal of Parasitology. – 1923. – Vol. 9. – №. 4. – P. 199–213.
27. Bombaça, A. C. S. Hydrogen peroxide resistance in *Strigomonas culicis*: Effects on mitochondrial functionality and *Aedes aegypti* interaction / A. C. S. Bombaça, F. de Almeida Dias, V. Ennes–Vidal, A. dos Santos Garcia–Gomes, M. H. F. Sorgine, C. M. d’Avila–Levy, R. F. S. Menna–Barreto // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 113. – P. 255–266.
28. Borghesan, T. C. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies / T. C. Borghesan, R. C. Ferreira, C. S. Takata, M. Campaner, C. C. Borda, F. Paiva, E. P. Camargo // Protist. – 2013. – Vol. 164. – №. 1. – P. 129–152.
29. 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) / T. C. Borghesan, M. Campaner, T. E. Matsumoto, O. A. Espinosa, V. Razafindranaivo, F. Paiva, E. P. Camargo // Frontiers in microbiology. – 2018. – Vol. 9. – C. 131.
30. Boulay, J. Evidence of active aggregation behaviour in *Lucilia sericata* larvae and possible implication of a conspecific mark / J. Boulay, C. Devigne, D. Gosset, D. Charabidze // Animal behaviour. – 2013. – Vol. 85. – №. 6. – P. 1191–1197.
31. Brandão, A. A. et al. The heterogeneity of choanomastigote–shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications / A. A. Brandao, A. Miranda, W. M. Degraive, M. A. Sousa // Parasitology research. – 2000. – Vol. 86. – №. 10. – P. 809–812.
32. Brun, R. Ultrastruktur und Zyklus von *Herpetomonas muscarum*, *Herpetomonas mirabilis* und *Crithidia luciliae* in *Chrysomya chloropyga* / R. Brun // Acta Tropica. – 1974. – Vol. 31 – №. 3. – P. 220–289.
33. Camargo, E. P. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyltransferase in a trypanosomatid / E. P. Camargo, E. Freymuller // Nature. – 1977. – T. 270. – №. 5632. – P. 52–53.
34. Camargo, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit / E. P. Camargo / E. P. Camargo // Adv. Parasitol. — 1999. — Vol. 42. — P. 29—112.

35. Catta-Preta, C. M. C. The presence of a symbiotic bacterium in *Strigomonas culicis* is related to differential ecto-phosphatase activity and influences the mosquito-protozoa interaction / C. M. C. Catta-Preta, M. T. C. Nascimento, M. C. F. Garcia, E. M. Saraiva, M. C. M. Motta, J. R. Meyer-Fernandes // International journal for parasitology. – 2013. – Vol. 43. – №. 7. – P. 571–577.
36. Catta-Preta, C. Endosymbiosis in trypanosomatid protozoa: the bacterium division is controlled during the host cell cycle / C. M. Catta-Preta, F. L. Brum, C. C. da Silva, A. A. Zuma, M. C. Elias, W. de Souza, M. C. M. Motta // Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 520.
37. Cavalcanti, D. P. et al. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis / D. P. Cavalcanti, M. Thiry, W. de Souza, M. C. M. Motta // Histochemistry and Cell Biology. – 2008. – Vol. 130. – №. 6. – P. 1177.
38. Chang, K. P. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* / K. P. Chang // The Journal of protozoology. – 1974. – Vol. 21. – №. 5. – P. 699–707.
39. Chang, K. P. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates / K. P. Chang, W. Trager // Science. – 1974. – Vol. 183. – №. 4124. – P. 531–532.
40. Chasen, N. M. Identification and localization of the first known proteins of the *Trypanosoma cruzi* cytostome cytopharynx endocytic complex / N. M. Chasen, I. Coppens, R. D. Etheridge // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2020. – Vol. 9. – P. 445.
41. Chaudhury, M. F. Volatiles emitted from eight wound-isolated bacteria differentially attract gravid screwworms (Diptera: Calliphoridae) to oviposit / M. F. Chaudhury, S. R. Skoda, A. Sagel, J. B. Welch // Journal of Medical Entomology. – 2010. – Vol. 47. – №. 3. – P. 349–354.
42. Chicharro, C. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients / C. Chicharro, J. Alvar // Annals of Tropical Medicine & Parasitology. – 2003. – Vol. 97. – №. sup1. – P. 75–78.
43. Corrêa-da-Silva, M. S. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* / M. S. Corrêa-da-Silva, P. Fampa, L. P. Lessa, E. dos Reis Silva, J. R. dos Santos Mallet, E. Saraiva, M. C. M. Motta // Parasitology research. – 2006. – Vol. 99. – №. 4. – P. 384–391.
44. Cox, F. E. G. History of human parasitology / F. E. G. Cox // Clinical microbiology reviews. – 2002. – Vol. 15. – №. 4. – P. 595–612.
45. Cywinska, A. Evaluation of DNA barcoding and identification of new haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies / A. Cywinska, M. A. Hannan, P. G. Kevan, R. E. Roughley, M. Iranpour, F. F. Hunter // Medical and Veterinary Entomology. – 2010. – Vol. 24. – №. 4. – P. 382–410.
46. d'Avila-Levy, C. M. Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction / C. M. d'Avila-

Levy, B. A. Silva, E. A. Hayashi, A. B. Vermelho, C. S. Alviano, E. M. Saraiva, A. L. Santos // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – Vol. 252. – №. 2. – P. 279–286.

47. d'Avila–Levy, C. M. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont–harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut / C. M. d'Avila–Levy, L. O. Santos, F. A. Marinho, F. P. Matteoli, A. H. Lopes, M. C. M. Motta, M. H. Branquinha // Experimental parasitology. – 2008. – Vol. 118. – №. 3. – P. 345–353.

48. d'Avila–Levy, C. M. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high–throughput DNA sequencing era / C. M. d'Avila–Levy, C. Boucinha, A. Kostygov, H. L. C. Santos, K. A. Morelli, A. Grybchuk–Ieremenko, J. Lukeš // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2015. – Vol. 110. – P. 956–965.

49. de Menezes, M. C. N. D. Nutritional Requirements of *Blastocrithidia culicis*, a Trypanosomatid with an Endosymbiont / M. C. N. D. de Menezes, I. Roitmanz // The Journal of protozoology. – 1991. – Vol. 38. – №. 2. – P. 122–123.

50. de Souza, W. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family / W. de Souza, M. C. M. Motta // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 173. – №. 1. – P. 1–8.

51. Dedet, J. P. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV / J. P. Dedet, B. Roche, F. Pratlong, D. Cales–Quist, J. Jouannelle, J. C. Benichou, M. Huerre // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1995. – Vol. 89. – №. 6. – P. 644–646.

52. Dedet, J. P. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents / J. P. Dedet, F. Pratlong // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2000. – Vol. 47. – №. 1. – P. 37–39.

53. Dobell, C. et al. Antony van Leeuwenhoek and his " Little Animals." Being Some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and his Multifarious Discoveries in these Disciplines. Collected, Translated, and Edited, from his Printed Works, Unpublished Manuscripts, and Contemporary Records. Published on the 300th Anniversary of his Birth // Antony van Leeuwenhoek and his " Little Animals." Being Some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and his Multifarious Discoveries in these Disciplines. Collected, Translated, and Edited, from his Printed Works, Unpublished Manuscripts, and Contemporary Records. Published on the 300th Anniversary of his Birth. – 1932.

54. Doflein, F. Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger nach biologischen Gesichtspunkten dargestellt / F. Doflein. — Jena: Verlag von Gustav Fisher, 1901. — 298.

55. Du, Y. Monophyletic origin of beta–division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia spp.* / Y. Du, D.

A. Maslov, K. P. Chang // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994 a. – Vol. 91. – №. 18. – P. 8437–8441.

56. Du, Y. 16S ribosomal DNA sequence identities of beta–proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species / Y. Du, G. McLaughlin, K. Chang // Journal of bacteriology. – 1994 b. – Vol. 176. – №. 10. – P. 3081–3084.

57. Dubosc, O. *Selenococidium intermedium* Lég. et Dub. et la systématique des sporozoaires / O. Dubosc, L. Léger. Cette : sn, 1910.

58. Esteves, M. J. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiote / M. J. Esteves, A. F. Andrade, J. Angluster, W. De Souza, M. H. Mundim, I. Roitman, M. E. Perreira // European journal of cell biology. – 1982. – Vol. 26. – №. 2. – P. 244–248.

59. Fampa, P. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines / P. Fampa, M. S. Corrêa–da–Silva, D. C. Lima, S. M. Oliveira, M. C. M. Motta, E. M. Saraiva // International journal for parasitology. – 2003. – Vol. 33. – №. 10. – P. 1019–1026.

60. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / Felsenstein J. // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – №. 4. – P. 783–791.

61. Fiorini, J. E. Três novas espécies de tripanosomatídeos de insetos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil / J. E. Fiorini, P. M. D. F. Silva, M. J. Soares, R. P. Brazil // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 1989. – Vol. 84. – №. 1. – P. 69–74.

62. Flegontov, P. *Paratrypanosoma* is a novel early–branching trypanosomatid / P. Flegontov, J. Votýpka, T. Skalický, M. D. Logacheva, A. A. Penin, G. Tanifuji, J. Lukeš // Current Biology. – 2013. – Vol. 23. – №. 18. – P. 1787–1793.

63. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from metazoan invertebrates / O. Folmer // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. – 1994. – Vol. 3. – P. 294–299.

64. Fox, D. T. Error–prone polyploid mitosis during normal *Drosophila* development / D. T. Fox, J. G. Gall, A. C. Spradling // Genes & development. – 2010. – Vol. 24. – №. 20. – P. 2294–2302.

65. Freymuller, E. Ultrastructural studies on the trypanosomatid *Phytomonas serpens* in the salivary glands of a phytophagous hemipteran / E. Freymuller, R. Milder, J. V. Jankevicius, S. I. Jankevicius, E. P. Camargo // The Journal of protozoology. – 1990. – Vol. 37. – №. 3. – P. 225–229.

66. Freymuller, E. Ultrastructural differences between species of Trypanosomatids with and without Endosymbionts / E. Freymuller, E. P. Camargo // The Journal of protozoology. – 1981. – Vol. 28. – №. 2. – P. 175–182.

67. Frolov, A. O. Back to monoxeny: *Phytomonas nordicus* descended from dixenous plant parasites / A. O. Frolov, M. N. Malysheva, V. Yurchenko, A. Y. Kostygov // European journal of protistology. – 2016. – Vol. 52. – P. 1–10.
68. Frolov, A. O. 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* / A. O. Frolov, M. N. Malysheva, A. I. Ganyukova, V. V. Spodareva, V. Yurchenko, A. Y. Kostygov // Plos One. – 2019. – Vol. 14. – №. 4. – P. e0214484.
69. Frolov, A. O. If host is refractory, insistent parasite goes berserk: Trypanosomatid *Blastocrithidia raabei* in the dock bug *Coreus marginatus* / A. O. Frolov, M. N. Malysheva, A. I. Ganyukova, V. V. Spodareva, J. Králová, V. Yurchenko, A. Y. Kostygov // PloS one. – 2020. – Vol. 15. – №. 1. – P. e0227832.
70. Frolov, A. O. Comparative morphology of kinetoplastids / A. O. Frolov, S. A. Karpov // Tsitologiya. – 1995. – Vol. 37. – №. 11. – P. 1072–1096.
71. Frolov, A. O. Development of monoxenous trypanosomatids and phytomonads in insects / A. O. Frolov, A. Y. Kostygov, V. Yurchenko // Trends in Parasitology. – 2021. – Vol. 37. – №. 6. – P. 538–551.
72. Frossard, M. L. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids / M. L. Frossard, S. H. Seabra, R. A. DaMatta, W. de Souza, F. G. de Mello, M. C. M. Motta // Biochemical and biophysical research communications. – 2006. – Vol. 343. – №. 2. – P. 443–449.
73. Gadelha, C. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa / C. Gadelha, B. Wickstead, W. de Souza, K. Gull, N. Cunha-e-Silva // Eukaryotic cell. – 2005. – Vol. 4. – №. 3. – P. 516–525.
74. Garin, Y. J. F. Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model / Y. J. Garin, A. Sulahian, P. Méneceur, F. Pratlong, E. Prina, J. P. Gangneux, F. Derouin // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2001. – Vol. 48. – №. 2. – P. 170–176.
75. Gerasimov, E. S. From cryptogene to gene? ND8 editing domain reduction in insect trypanosomatids / E. S. Gerasimov, A. Y. Kostygov, S. Yan, A. A. Kolesnikov // European journal of protistology. – 2012. – Vol. 48. – №. 3. – P. 185–193.
76. Ghosh, S. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian leishmaniasis / S. Ghosh, P. Banerjee, A. Sarkar, S. Datta, M. Chatterjee // Journal of clinical microbiology. – 2012. – Vol. 50. – №. 8. – P. 2774–2778.

77. Gill, J. W. Lysine synthesis and phylogeny: biochemical evidence for a bacterial-type endosymbiote in the protozoon *Herpetomonas (Strigomonas) oncopelti* / J. W. Gill, H. J. Vogel // *Biochimica et biophysica acta*. – 1962. – Vol. 56. – P. 200–201.
78. Gill, J. W. A bacterial endosymbiote in *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*: biochemical and morphological aspects / J. W. Gill, H. J. Vogel // *The Journal of Protozoology*. – 1963. – Vol. 10. – №. 2. – P. 148–152.
79. Guindon, S. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood / S. Guindon, O. Gascuel // *Systematic biology*. – 2003. – Vol. 52. – №. 5. – P. 696–704.
80. Gupta, B. L. 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 / B. L. Gupta, M. J. Berridge // *Journal of morphology*. – 1966. – Vol. 120. – №. 1. – P. 23–81.
81. Gutteridge, W. E. An electron microscopic study of the bipolar bodies in *Crithidia oncopelti* / W. E. Gutteridge, R. F. Macadam // *The Journal of protozoology*. – 1971. – Vol. 18. – №. 4. – P. 637–640.
82. Hamilton, P. T. Infection dynamics and immune response in a newly described *Drosophila*–trypanosomatid association / P. T. Hamilton, J. Votýpka, A. Dostálová, V. Yurchenko, N. H. Bird, J. Lukeš, S. J. Perlman // *MBio*. – 2015. – Vol. 6. – №. 5. – P. e01356–15.
83. Harmer, J. Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution / J. Harmer, V. Yurchenko, A. Nenarokova, J. Lukeš, M. L. Ginger, // *Parasitology*. – 2018. – Vol. 145. – №. 10. – P. 1311–1323.
84. Hoare, C. A. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology / C. A. Hoare, F. G. Wallace // *Nature*. – 1966. – Vol. 212. – №. 5068. – P. 1385–1386.
85. Hoare, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. Revision of the systematics / C. A. Hoare // *J. Protozool.* — 1964. — Vol. 11. — P. 200–207.
86. Hollar, L. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy / L. Hollar, J. Lukeš, D. A. Maslov // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 1998. – Vol. 45. – №. 3. – P. 293–297.
87. Honigberg, B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates / B. M. Honigberg // *Progress in Protozoology* / Eds. J. Ludvik, J. Lom, J. Vavra. — New York and London: Academic Press, 1963. — P. 68.
88. Hu, C. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* / C. Hu, S. Aksoy // *Molecular microbiology*. – 2006. – Vol. 60. – №. 5. – P. 1194–1204.

89. Hupperich, K. Ultrastructural study of the host–parasite relationship of trypanosomatids in the housefly / K. Hupperich, E. P. Camargo, R. Milder // *Parasitology research*. – 1992. – Vol. 78. – №. 1. – P. 48–55.
90. Jankevicius, J. V. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes / J. V. Jankevicius, S. I. Jankevicius, M. Campaner, I. Conchon, L. A. Maeda, M. M. Teixeira, E. P. Camargo // *The Journal of protozoology*. – 1989. – Vol. 36. – №. 3. – P. 265–271.
91. Jaskowska, E. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments / E. Jaskowska, C. Butler, G. Preston, S. Kelly // *PLoS pathogens*. – 2015. – Vol. 11. – №. 1. – C. e1004484.
92. Kent, W. S. A manual of the Infusoria / W. S. Kent. — London, 1880. — Pt. 1—3. — 433 p.
93. 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 / C. C. H. Khoo, K. H. Tan // *Microscopy research and technique*. – 2005. – Vol. 67. – №. 5. – P. 219–226.
94. Klein, C. C. Biosynthesis of vitamins and cofactors in bacterium–harbouring trypanosomatids depends on the symbiotic association as revealed by genomic analyses / C. C. Klein, J. M. Alves, M. G. Serrano, G. A. Buck, A. T. R. Vasconcelos, M. F. Sagot, M. C. M. Motta // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – №. 11. – P. e79786.
95. Kořený, L. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? / L. Kořený, J. Lukeš, M. Oborník // *International journal for parasitology*. – 2010. – Vol. 40. – №. 2. – P. 149–156.
96. Kořený, L. Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability / L. Kořený, R. Sobotka, J. Kovářová, A. Gnipová, P. Flegontov, A. Horváth, J. Lukeš // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – №. 10. – P. 3808–3813.
97. Kořený, L. Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites / L. Kořený, M. Oborník, J. Lukeš // *PLoS pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – №. 1. – P. e1003088.
98. Kostygov, A. Y. Molecular revision of the genus *Wallaceina* / A. Y. Kostygov, A. Grybchuk–Ieremenko, M. N. Malysheva, A. O. Frolov, V. Yurchenko // *Protist*. – 2014. – Vol. 165. – №. 5. – P. 594–604.
99. Kostygov, A. Y. Novel trypanosomatid–bacterium association: evolution of endosymbiosis in action / A. Y. Kostygov, E. Dobáková, A. Grybchuk–Ieremenko, D. Váhala, D. A. Maslov, J. Votýpka, V. Yurchenko // *MBio*. – 2016. – Vol. 7. – №. 2. – P. e01985–15.
100. Kostygov, A. Y. Genome of *Ca. Pandoraea novymonadis*, an endosymbiotic bacterium of the trypanosomatid *Novymonas esmeraldas* / A. Y. Kostygov, A. Butenko, A. Nenarokova, D.

Tashyreva, P. Flegontov, J. Lukeš, V. Yurchenko //Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1940.

101. Kozminsky, E. Host–specificity of monoxenous trypanosomatids: statistical analysis of the distribution and transmission patterns of the parasites from Neotropical Heteroptera / E. Kozminsky, N. Kraeva, A. Ishemgulova, E. Dobáková, J. Lukeš, P. Kment, D. A. Maslov // Protist. – 2015. – Vol. 166. – №. 5. – P. 551–568.

102. Kraeva, N. *Leptomonas seymouri*: adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co–infection with *Leishmania donovani* / N. Kraeva, A. Butenko, J. Hlaváčová, A. Kostygov, J. Myšková, D. Grybchuk, V. Yurchenko // PLoS pathogens. – 2015. – Vol. 11. – №. 8. – P. e1005127.

103. Králová, J. Insect trypanosomatids in Papua New Guinea: high endemism and diversity / J. Králová, A. Grybchuk–Ieremenko, J. Votýpka, V. Novotný, P. Kment, J. Lukeš, A. Y. Kostygov // International journal for parasitology. – 2019. – Vol. 49. – №. 13–14. – P. 1075–1086.

104. Kumar, S., MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura //Molecular biology and evolution. – 2016. – Vol. 33. – №. 7. – P. 1870–1874.

105. Lafont, A. Sur la presence d'un parasite de la classe des flagelles dans le latex de *Euphorbia pilulifera* /A. Lafont // Compt. Rend. Soc. Biol. — 1909. — Vol. 66. — P. 1011–1013.

106. Loyola–Machado, A. C. et al. The symbiotic bacterium fuels the energy metabolism of the host trypanosomatid *Strigomonas culicis* / A. C. Loyola–Machado, A. C. Azevedo–Martins, C. M. C. Catta–Preta, W. de Souza, A. Galina, M. C. M. Motta //Protist. – 2017. – Vol. 168. – №. 2. – P. 253–269.

107. Lukeš, J. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure / J. Lukeš, D. Lys Guilbride, J. Votýpka, A. Zíková, R. Benne, P. T. Englund, // Eukaryotic cell. – 2002. – Vol. 1. – №. 4. – P. 495–502.

108. Lukeš, J. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates / J. Lukeš, T. Skalický, J. Týč, J. Votýpka, V. Yurchenko // Molecular and biochemical parasitology. – 2014. – Vol. 195. – №. 2. – P. 115–122.

109. Lukeš, J. Trypanosomatids are much more than just trypanosomes: clues from the expanded family tree / J. Lukeš, A. Butenko, H. Hashimi, D. A. Maslov, J. Votýpka, V. Yurchenko // Trends in parasitology. – 2018. – Vol. 34. – №. 6. – P. 466–480.

110. Lukeš, J. Characterization of a new cosmopolitan genus of trypanosomatid parasites, *Obscuromonas* gen. nov. (Blastocrithidiinae subfam. nov.) / J. Lukeš, M. Tesařová, V. Yurchenko, J. Votýpka //European Journal of Protistology. – 2021. – Vol. 79. – P. 125778.

111. Lwoff, M. Le pouvoir de synthese des trypanosomides des culicides / M. Lwoff // Compt. Rend. Soc. Biol. Paris. — 1935. — Vol. 119. — P. 969—971.
112. Lwoff, M. Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides / M. Lwoff // Paris, Masson et cie, 1940.
113. Lwoff, M. Recherches sur la morphologie de *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden et *Leptomonas fasciculata* Novy, MacNeal et Torrey / M. Lwoff, A. Lwoff // Archives Zoologic Experimental Général. — 1931. — Vol. 71. — P. 21–37.
114. Mackinnon, D. L. Herpetomonads from the alimentary tract of certain dung-flies / D. L. Mackinnon // Parasitology. — 1910. — Vol. 3. — №. 3. — P. 255–274.
115. Malysheva, M. N. Culture collection of parasitic protists at the Zoological Institute RAS (CCPP ZIN RAS) / M. N. Malysheva, M. A. Mamkaeva, A. Y. Kostygov, A. O. Frolov, S. A. Karpov, // Protistology. — 2016. — Vol. 10. — №. 1.
116. Maslov, D. A. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica / D. A. Maslov, V. Y. Yurchenko, M. Jirků, J. Lukeš, // J. Euk. Microbiol. — 2010. — Vol. 57. — № 2. — P. 177—188.
117. McGhee, R. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae / R. B. McGhee, W. B. Cosgrove // Microbiological reviews. — 1980. — Vol. 44. — №. 1. — P. 140–173.
118. Mense, S. M. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases / S. M. Mense, L. Zhang // Cell research. — 2006. — Vol. 16. — №. 8. — P. 681–692.
119. Merzlyak, E. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia* / E. Merzlyak, V. Yurchenko, A. A. Kolesnikov, K. Alexandrov, S. A. Podlipaev, D. A. Maslov // Journal of Eukaryotic Microbiology. — 2001. — Vol. 48. — №. 2. — P. 161–169.
120. Molyneux, D. H. Vector relationships in the Trypanosomatidae / D. H. Molyneux // Advances in parasitology. — 1977. — Vol. 15. — P. 1–82.
121. Morales, J. Development of a toolbox to dissect host–endosymbiont interactions and protein trafficking in the trypanosomatid *Angomonas deanei* / J. Morales, S. Kokkori, D. Weidauer, J. Chapman, E. Goltsman, D. Rokhsar, E. Nowack // BMC Evolutionary Biology. — 2016. — Vol. 16. — №. 1. — P. 1–12.
122. Moreira, D. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea / D. Moreira, P. López–García, K. Vickerman // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2004. — Vol. 54. — №. 5. — P. 1861–1875.

123. Motta, M. C. M. Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas angulsteri* / M. C. M. Motta, A. M. S. Cava, P. M. Silva, J. E. Fiorini, M. J. Soares, W. D. Souza // Canadian Journal of Zoology. – 1991. – Vol. 69. – №. 3. – P. 571–577.
124. Motta, M. C. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont / M. C. Motta, M. J. Soares, M. Attias, J. Morgado, A. P. Lemos, J. Saad–Nehme, W. De Souza // European journal of cell biology. – 1997. – Vol. 72. – №. 4. – P. 370–377.
125. Motta, M. C. M. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus / M. C. M. Motta, C. M. C. Catta–Preta, S. Schenkman, A. C. D. A. Martins, K. Miranda, W. de Souza, M. C. Elias // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – №. 8. – P. e12415.
126. Motta, M. C. M. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family / M. C. M. Motta, A. C. D. A. Martins, S. S. A. de Souza, C. M. C. Catta–Preta, R. Silva, C. C. Klein, A. T. R. de Vasconcelos // PloS one. – 2013. – Vol. 8. – №. 4. – P. e60209.
127. Moya, A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses / A. Moya, J. Peretó, R. Gil, A. Latorre // Nature Reviews Genetics. – 2008. – Vol. 9. – №. 3. – P. 218–229.
128. Mundim, M. H. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei* / M. H. Mundim, I. Roitman // The Journal of Protozoology. – 1977. – Vol. 24. – №. 2. – P. 329–331.
129. Nascimento, M. T. C. Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland / M. T. C. Nascimento, M. C. F. Garcia, K. P. da Silva, L. H. Pinto–da–Silva, G. C. Atella, M. C. M. Motta, E. M. Saraiva // Acta Tropica. – 2010. – Vol. 113. – №. 3. – P. 269–278.
130. Newton, B. A. A synthetic growth medium for the trypanosomid flagellate *Strigomonas* (*Herpetomonas*) *oncopelti* / B. A. Newton // Nature. – 1956. – Vol. 177. – №. 4502. – P. 279–280.
131. Newton, B. A. Nutritional requirements and biosynthetic capabilities of the parasitic flagellate *Strigomonas oncopelti* / B. A. Newton // Microbiology. – 1957. – Vol. 17. – №. 3. – P. 708–717.
132. Newton, B. A. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*: I. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein / B. A. Newton, R. W. Horne // Experimental cell research. – 1957. – Vol. 13. – №. 3. – P. 563–574.

133. Noguchi, H. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias: I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants / H. Noguchi, E. B. Tilden // *The Journal of experimental medicine*. – 1926. – Vol. 44. – №. 3. – P. 307–325.
134. Novy, F. G. The trypanosomes of tsetse flies / F. G. Novy // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1906. – P. 394–411.
135. Novy, F. G. On the trypanosomes of birds / F. G. Novy, W. MacNeal // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1905. – P. 256–308.
136. Novy, F. The trypanosomes of mosquitoes and other insects / F. G. Novy, W. J. MacNeal, H. N. Torrey // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1907. – P. 223–276.
137. Nowack, E. C. M. Endosymbiotic associations within protists / E. C. M. Nowack, M. Melkonian // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2010. – Vol. 365. – №. 1541. – P. 699–712.
138. Oda, L. M. Surface Anionic Groups in Symbiote-Bearing and Symbiote-Free Strains of *Crithidia deanei* / L. M. Oda, C. S. Alviano, F. C. S. Filho, J. Angluster, I. Roitman, W. D. Souza // *The Journal of protozoology*. – 1984. – Vol. 31. – №. 1. – P. 131–134.
139. Pacheco, R. S. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient / R. S. Pacheco, M. C. Marzochi, M. Q. Pires, C. M. Brito, M. D. F. Madeira, E. G. Barbosa–Santos E. G. // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 1998. – Vol. 93. – P. 531–537.
140. Panek, H. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis / H. Panek, M. R. O'Brian // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 148. – №. 8. – P. 2273–2282.
141. Panizzi, A. R. Stink bugs (Pentatomidae) / A. R. Panizzi // *Heteroptera of economic importance*. – 2000. – Vol. 828.
142. Patton, W. S. Inoculation of dogs with the parasite of kala azar (*Herpetomonas [Leishmania] donovani*) with some remarks on the genus *Herpetomonas* / W. S. Patton // *Parasitology*. – 1908. – Vol. 1. – №. 4. – P. 311–313.
143. Penha, L. L. Symbiont modulates expression of specific gene categories in *Angomonas deanei* / L. L. Penha, L. Hoffmann, S. S. A. D. Souza, A. C. D. A. Martins, T. Bottaro, F. Prosdocimi, R. Silva // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2016. – Vol. 111. – P. 686–691.
144. Podlipaev, S. The more insect trypanosomatids under study—the more diverse Trypanosomatidae appears / S. Podlipaev // *International journal for parasitology*. – 2001. – Vol. 31. – №. 5–6. – P. 648–652.
145. Pont, A. C. 90. Family Calliphoridae / A. C. Pont // *Catalogue of the Diptera of the Afrotropical Region*. – 1980.

146. Prowazek, S. Die Entwicklung von *Herpetomonas*, einem mit den Trypanosomen verwandten Flagellaten / S. Prowazek // Arb Gesundh–Amte (Berl). – 1904. – Vol. 20. – C. 440–452.
147. Pyne, C. K. Etude de la structure infra microscopique de *Strigomonas oncopelti* / C. K. Pyne // 1st International Conference of Protozoology. – 1961. – Vol. 172.
148. Roger, A. J. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree / A. J. Roger, A. G. B. Simpson // Current Biology. – 2009. – Vol. 19. – №. 4. – P. R165–R167.
149. Roitman, I. Endosymbionts of trypanosomatidae / I. Roitman, E. P. Camargo // Parasitology today (Personal ed.). – 1985. – Vol. 1. – №. 5. – P. 143–144.
150. Ronquist, F. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, J. P. Huelsenbeck // Systematic biology. – 2012. – Vol. 61. – №. 3. – P. 539–542.
151. Saitou, N. The neighbor–joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular biology and evolution. – 1987. – Vol. 4. – №. 4. – P. 406–425.
152. Saulich, A. K. Seasonal cycles in stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the temperate zone: diversity and control / A. K. Saulich, D. L. Musolin // Entomological Review. – 2014. – T. 94. – №. 6. – P. 785–814.
153. Schaub, G. A. The effects of trypanosomatids on insects / G. A. Schaub // Advances in parasitology. – 1992. – Vol. 31. – P. 255–319.
154. Schaub, G. A. Developmental time and mortality of the reduviid bug *Triatoma infestans* with differential exposure to coprophagic infections with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) / G. A. Schaub, C. Jensen // Journal of invertebrate pathology. – 1990. – Vol. 55. – №. 1. – P. 17–27.
155. Schaub, G. A. Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) / G. A. Schaub, M. Pretsch // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1981. – Vol. 75. – №. 1. – P. 168–171.
156. Schaub, G. A. Influence of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the reduviid bug *Triatoma infestans*: alterations in the Malpighian tubules / G. A. Schaub, A. Schnitker // Parasitology research. – 1988. – Vol. 75. – №. 2. – P. 88–97.
157. Schmidt, J. A. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans* / J. Schmidt, T. Kleffmann, G. A. Schaub // Parasitology research. – 1998. – Vol. 84. – №. 7. – P. 527–536.
158. Schuh, R. T. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera): classification and natural history / R. T. Schuh, J. A. Slater. Cornell University press, 1995.
159. Schwarz, R. S. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp /

R. S. Schwarz, G. R. Bauchan, C. A. Murphy, J. Ravoet, D. C. de Graaf, J. D. Evans // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2015. – Vol. 62. – №. 5. – P. 567–583.

160. Seward, E. A. Description of *Phytomonas oxycareni* n. sp. from the salivary glands of *Oxycarenum lavaterae* / E. A. Seward, J. Votýpka, P. Kment, J. Lukeš, S. Kelly // *Protist*. – 2017. – Vol. 168. – №. 1. – P. 71–79.

161. Shaw, J. J. Brazilian phlebotomines as hosts and vectors of viruses, bacteria, fungi, protozoa (excluding those belonging to the genus *Leishmania*) and nematodes / J. J. Shaw, A. T. D. Rosa, A. C. Cruz, P. F. D. C. Vasconcelos // *Brazilian Sand Flies*. – Springer, Cham. – 2018. – P. 417–441.

162. Silva, F. E. *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989) N. Comb.: A Trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm / P. M. F. E. Silva, A. M. Solé-Cava, M. J. Soares, M. C. M. Motta, J. E. Fiorini, W. D. Souza // *The Journal of protozoology*. – 1991. – Vol. 38. – №. 5. – P. 489–494.

163. Silva, F. M. The reduced genome of *Candidatus Kinetoplastibacterium sorsogonicusi*, the endosymbiont of *Kentomonas sorsogonicus* (Trypanosomatidae): loss of the haem-synthesis pathway / F. M. Silva, A. Y. Kostygov, V. V. Spodareva, A. Butenko, R. Tossou, J. Lukeš, J. M. Alves // *Parasitology*. – 2018. – Vol. 145. – №. 10. – P. 1287–1293.

164. Simpson, A. G. B. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids / A. G. Simpson, E. E. Gill, H. A. Callahan, R. W. Litaker, A. J. Roger // *Protist*. – 2004. – Vol. 155. – №. 4. – P. 407–422.

165. Skalický, T. Endosymbiont capture, a repeated process of endosymbiont transfer with replacement in trypanosomatids *Angomonas spp.* / T. Skalický, J. M. Alves, A. C. Morais, J. Režnarová, A. Butenko, J. Lukeš, A. Y. Kostygov // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10. – №. 6. – P. 702.

166. Smith, K. G. V. *A manual of forensic entomology* / K. G. V. Smith. New York: British Museum/Comstock Publishing Associates, 1986.

167. Sousa, M. A. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973. Proposal of a new genus / M. A. Sousa, S. Côrte-Real // *Rev Inst Med Trop São Paulo*. – 1991. – №. 33.

168. Svobodová, M. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera) / M. Svobodová, L. Zídková, I. Čepička, M. Oborník, J. Lukeš, J. Votýpka // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2007. – Vol. 57. – №. 2. – P. 423–432.

169. Takata, C. S. Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas* / C. S. A. Takata, E. P. Camargo, R. V. Milder // *European Journal of Protistology*. – 1996. – Vol. 32. – №. 1. – P. 90–95.

170. Tamura, K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – №. 30. – P. 11030–11035.
171. Teixeira, M. M. G. 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 / M. M. Teixeira, T. C. Borghesan, R. C. Ferreira, M. A. Santos, C. S. Takata, M. Campaner, E. P. Camargo // *Protist*. – 2011. – Vol. 162. – №. 3. – P. 503–524.
172. Thomson, J. G. The relationship of certain plant and insect flagellates to the sub-genus *Strigomonas* M. and A. Lwoff, 1931 / J. G. Thomson, A. Robertson // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1932. – Vol. 25. – №. 4. – P. 287–291.
173. Tomberlin, J. K. A review of bacterial interactions with blow flies (Diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance / J. K. Tomberlin, T. L. Crippen, A. M. Tarone, M. F. Chaudhury, B. Singh, J. A. Cammack, R. P. Meisel // *Annals of the Entomological Society of America*. – 2017. – Vol. 110. – №. 1. – P. 19–36.
174. Týč, J. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity / J. Týč, J. Votýpka, H. Klepetková, H. Šuláková, M. Jirků, J. Lukeš // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2013. – Vol. 69. – №. 1. – P. 255–264.
175. Vickerman, K. Comparative cell biology of the Trypanosomatids / K. Vickerman, T. M. Preston // *Biology of the Kinetoplastida*. – 1976 a. – Vol. 1. – P. 35–130.
176. Vickerman, K. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates / K. Vickerman, T. M. Preston // *Biology of Kinetoplastida*. — London: Academic press, 1976 b— Vol. 1.—P. 35—130.
177. Vickerman, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates / K. Vickerman // *Biology of the Kinetoplastida* / edited by W. H. R. Lumsden, D. A. Evans. — London, New York, San Francisco: Academic Press, 1976 b — Vol. 1. — P. 1—34.
178. Vickerman, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates / K. Vickerman // *Int. J. Parasitol.* — 1994. — Vol. 24. — № 8. — P. 1317—1331.
179. Vinogradova, E. B. The rate of preimaginal development of the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae) under field and laboratory conditions / E. B. Vinogradova, S. Y. Reznik // *Entomological review*. – 2013. – Vol. 93. – №. 5. – P. 533–539.
180. Votýpka, J. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n / J. Votýpka, A. Y. Kostygov, N. Kraeva, A. Grybchuk–Ieremenko, M. Tesařová, D. Grybchuk, V. Yurchenko // *Protist*. – 2014. – Vol. 165. – №. 6. – P. 825–838.

181. Votýpka, J. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description / J. Votýpka, C. M. d'Avila-Levy, P. Grellier, D. A. Maslov, J. Lukeš, V. Yurchenko, // Trends in Parasitology. – 2015. – Vol. 31. – №. 10. – P. 460–469.
182. Votýpka, J. Endangered monoxenous trypanosomatid parasites: a lesson from island biogeography / J. Votýpka, P. Kment, V. Yurchenko, J. Lukeš, // Biodiversity and Conservation. – 2020. – Vol. 29. – №. 13. – P. 3635–3667.
183. Votýpka, J. How monoxenous trypanosomatids revealed hidden feeding habits of their tsetse fly hosts / J. Votýpka, K. J. Petrželková, J. Brzoňová, M. Jirků, D. Modrý, J. Lukeš, // Folia Parasitologica. – 2021. – Vol. 68. – P. 019.
184. Wall, B. J. Structure and function of the rectum in insects / B. J. Wall, J. L. Oschman //Fortschr. Zool. – 1975. – Vol. 23. – №. 2–3. – P. 193–222.
185. Wallace, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids / F. G. Wallace // Experimental parasitology. – 1966. – Vol. 18. – №. 1. – P. 124–193.
186. Wenyon, C. M. Observations on *Herpetomonas muscae-domesticae* and some allied flagellates with special reference to the structure of their nuclei / C. M. Wenyon // Arch Protistenkd. – 1913. – Vol. 31. – №. 1. – P. 1–36.
187. Wenyon, C M. Protozoology / C. M. Wenyon. London: Bailliere, Tindall and Cox, 1926.— Vol. 1.
188. Yurchenko, V. Y. et al. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia* //Protist. – 2008. – Vol. 159. – №. 1. – P. 99–114.
189. Zanetti, A. *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae): phylogenetic analyses support infrageneric lineages and a new species transmitted to Solanaceae fruits by a pentatomid hemipteran / A. Zanetti, R. C. Ferreira, M. G. Serrano, C. S. Takata, M. Campaner, M. Attias, E. P. Camargo //European journal of protistology. – 2016. – Vol. 56. – P. 232–249.

**Приложение. Номера использованных последовательностей из базы
GenBank**

Ген 18S рРНК	
<i>Angomonas ambiguus</i>	HM593015.1
<i>Angomonas ambiguus</i> ISC0004	MG682147
<i>Angomonas ambiguus</i> ISC0011	MG682148
<i>Angomonas ambiguus</i> ISC1780	HM593015
<i>Angomonas deanei</i>	HM593011.1
<i>Angomonas deanei</i> TCC036 gen1	HM593011
<i>Angomonas deanei</i> TCC1639 gen3	KY888327
<i>Angomonas deanei</i> TCC1743 gen1	HM593043
<i>Angomonas deanei</i> TCC1759 gen2	KY888324
<i>Angomonas deanei</i> TCC2025 gen3	MG682159
<i>Angomonas deanei</i> TCC2332 gen2	KY888325
<i>Angomonas deanei</i> TCC2446 gen4	KY888328
<i>Angomonas deanei</i> TCC2447 gen4	KY888329
<i>Angomonas deanei</i> TCC2448 gen4	MG682169
<i>Angomonas deanei</i> TCC2455 gen2	KY888326
<i>Angomonas desouzai</i>	HM593017.1
<i>Angomonas desouzai</i> ISC0012	MG682144
<i>Angomonas desouzai</i> TCC079	HM593016
<i>Angomonas desouzai</i> TCC1310	KY888321
<i>Blastocrithidia papi</i>	KX641340.1
<i>Blastocrithidia raabei</i>	MN366353.1
<i>Blastocrithidia triatoma</i>	AF153037.2
<i>Blechomonas campbelli</i>	KF054134.1
<i>Blechomonas keelingi</i>	KF054129.1
<i>Blechomonas pulexsimulantis</i>	KF054129.1
<i>Crithidia brevicula</i>	KJ443345.1
<i>Crithidia dedva</i>	JN624299.1
<i>Crithidia fasciculata</i>	Y00055.1
<i>Herpetomonas costoris</i>	JQ359728
<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	U01013.1

<i>Herpetomonas muscarum</i>	L18872.1
<i>Herpetomonas muscarum</i>	JQ359731
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	U01016
<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	KM242075.1
<i>Kentomonas sp.</i> ECU-06	KC206003.1
<i>Kentomonas sp.</i> ECU-07	KC206002.1
<i>Lafontella mariadeanei</i>	JQ359714.1
<i>Leishmania donovani</i>	GQ332356.1
<i>Leishmania major</i>	GQ332361.1
<i>Leptomonas bifurcata</i>	DQ910925.1
<i>Leptomonas collosoma</i>	JN582046.1
<i>Leptomonas jaculum</i>	EF184218.2
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	XR_001548753.1
<i>Leptomonas samueli</i>	JQ359722.1
<i>Leptomonas scantii</i>	JN036654.1
<i>Leptomonas seymouri</i>	S78663
<i>Novymonas esmeraldas</i>	KT944309.1
<i>Paratrypanosoma confusum</i>	KF963538.1
<i>Phytomonas borealis</i>	MN442623.1
<i>Phytomonas dolleti</i> TCC215	KX219754.1
<i>Phytomonas dolleti</i> TCC231	AF016321.1
<i>Phytomonas francai</i>	KU659041.1
<i>Phytomonas lipae</i>	MK036050.1
<i>Phytomonas nordicus</i>	KT223609.1
<i>Phytomonas oxycareni</i>	MK249803
<i>Phytomonas sp.</i> PNG68	MK929442.1
<i>Phytomonas serpens</i>	AF016320.1
<i>Phytomonas serpens</i> 9T	AIHY01014107
<i>Phytomonas serpens</i> TCC220	KX219755
<i>Phytomonas sp.</i> PNG09	MK929400.1
<i>Phytomonas sp.</i> CC-71	MK056193.1
<i>Phytomonas sp.</i> CC-83	MK056194.1
<i>Phytomonas sp.</i> D53-Cu32	MG845926.1
<i>Phytomonas sp.</i> E.hi.Se	L35077

<i>Phytomonas</i> sp. EM1	CAVQ010000059
<i>Phytomonas</i> sp. G24	JQ658819.1
<i>Phytomonas</i> sp. G65	JQ658841.1
<i>Phytomonas</i> sp. Hart1	L35076.1
<i>Phytomonas</i> sp. Hart1	L35076.1
<i>Phytomonas</i> sp. PNG02	KY593709.2
<i>Phytomonas</i> sp. PNG128	MF969044
<i>Phytomonas</i> sp. PNG88	MN215473.1
<i>Phytomonas</i> sp. TCC084	KX219752.1
<i>Phytomonas</i> sp. TCC306	KU659045
<i>Sergeia podlipaevi</i>	DQ394362.1
<i>Strigomonas culicis</i>	HM593009.1
<i>Strigomonas galati</i>	HM593010.1
<i>Strigomonas oncopelti</i>	AF038025.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	M12676.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	FJ900239.2
<i>Trypanosoma pestanai</i>	AJ009159.1
<i>Wallacemonas collosoma</i>	AF153038.1
<i>Wallacemonas inconstans</i>	AF153044.2
<i>Wallacemonas</i> sp. Wsd	JN582045.1
<i>Zelonia costaricensis</i>	KX790782.1

Ген 16S рPHK	
<i>Achromobacter pulmonis</i>	MG722684.1
<i>Bordetella avium</i>	CP019929.1
<i>Ca. Kinetoplastibacterium blastocrithidii</i> TCC012	NR102505
<i>Ca. Kinetoplastibacterium blastocrithidii</i> TCC30268	L29265
<i>Ca. Kinetoplastibacterium crithidii</i> TCC036	NR102502
<i>Ca. Kinetoplastibacterium crithidii</i> TCC2435	JADMLC000000000.1
<i>Ca. Kinetoplastibacterium crithidii</i> TCC30255	CP003978.1
<i>Ca. Kinetoplastibacterium crithidii</i>	L29303.1
<i>Ca. Kinetoplastibacterium desouzaii</i> TCC079	NR102501
<i>Ca. Kinetoplastibacterium galati</i> TCC219	NR102504

<i>Ca. Kinetoplastibacterium oncopelti</i> TCC043	HM592997
<i>Ca. Kinetoplastibacterium oncopelti</i> TCC290	NR102503
<i>Ca. Kinetoplastibacterium sorsogonicusi</i>	KM242070