

УДК 576.893.161.13: 57.063.7

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН КОНФЛИКТА ТАКСОНОМИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНИИ ТРИПАНОСОМАТИД
НА ПРИМЕРЕ *LEPTOMONAS NABICULAE* PODLIPAEV, 1987**

© А. Ю. Костыгов,¹ М. Н. Малышева, А. О. Фролов

Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034

¹E-mail: kostygov@gmail.com

Поступила 28.09.2011

Результаты исследований *Leptomonas nabiculae*, проведенных на разном материале (культуры D2 и Nfm2) и при помощи различных молекулярных маркеров, вступали в конфликт друг с другом и с таксономическим положением этого вида. Мы изучили морфологию клеток в этих культурах а также гапантотипах *L. nabiculae* и описанных из того же вида хозяина *L. peterhoffi* и *L. occidentalis*. Кроме того, мы реконструировали филогению по гену 18S рРНК с использованием сиквенсов от обеих культур. Культура D2 по морфологическим признакам и филогенетическому положению оказалась критидией, которая сопутствовала *L. nabiculae* в смешанном заражении. Мы дали ей название *Crithidia dedva*. Клетки на гапантотипах всех трех видов рода *Leptomonas* и в культуре Nfm2 представляют собой один и тот же вид, который судя по морфологии и молекулярной филогении, относится к роду *Herpetomonas* (*H. nabiculae*). Также мы показали, что ранее определенная последовательность гена 18S рРНК Nfm2 являлась химерной. Из-за этого данный вид занимал неверное положение на филогенетическом древе, что противоречило результатам филогенетического анализа по гену 5S рРНК.

Ключевые слова: *Leptomonas*, *Herpetomonas nabiculae*, *Crithidia dedva*, смешанное заражение, молекулярная филогения.

Систематика сем. Trypanosomatidae на протяжении последних двух десятилетий переживает глубокий кризис. Традиционная схема родовой классификации (Hoare, Wallace 1966; Vickerman, 1976), согласно которой роды различаются по типу жизненного цикла (гомо- или гетероксенный) и наличию в нем характерных клеточных морфотипов (про-, эпи-, опистомастигота и пр.), постоянно вступает в конфликт с результатами новейших сравнительно-биохимических и молекулярно-филогенетических исследований. Между тем выявляемые таким образом группы трипаносоматид обычно не выглядят случайными наборами видов. Детальный анализ морфологии организмов, входящих в их состав, в ряде случаев позволяет выявить комплекс признаков, подтверждающих их филогенетическую бли-

зость. Так, парадоксальные с точки зрения морфотипической концепции филогенетические группы симбионт-содержащих и цистообразующих трипаносоматид имеют хорошее морфологическое обоснование (Freimuller, Camargo, 1981; Hollar et al., 1998; Костыгов, Фролов, 2007). Следовательно, традиционная классификация, которая базируется на весьма ограниченном наборе признаков, не может быть достаточной для построения филогенетически обоснованной системы.

Однако есть и другие причины несоответствия филогении и таксономии в этом семействе. Для молекулярно-филогенетических исследований трипаносоматид обычно используют лабораторные культуры, при этом нередко морфология клеток, выделяемых в такие культуры, недостаточно хорошо изучена или не изучена вовсе. Зачастую следствием этого становится ошибочное определение их родовой принадлежности. Так, например, *Leptomonas lactosovorans* при описании был отнесен к роду *Leptomonas* на основании того, что у него были обнаружены лишь промастиготы (Manaia et al., 1981). Однако, по данным филогенетического анализа с использованием гена gGAPDH, этот вид связан с представителями рода *Herpetomonas* (Zidkova et al., 2010), что, на первый взгляд, демонстрирует конфликт молекулярных и морфологических данных. На самом деле культура *L. lactosovorans*, как оказалось, содержит характерные для рода *Herpetomonas* опистомастиготы, хотя и в весьма малых количествах, из-за чего их и не смогли обнаружить ранее (Sousa et al., 1998).

Еще одним источником конфликта молекулярных и морфологических данных является исследование культур, полученных из хозяев зараженных одновременно несколькими видами трипаносоматид. Так, исходное описание *Leptomonas peterhoffi* (Подлипаев, 1985) было выполнено на материале из смешанного заражения. В основу диагноза была положена характеристика преобладающих в хозяине клеток. Однако в лабораторной культуре морфология клеток была совершенно иной. Позднее было показано, что благодаря селективному преимуществу в культуре остались лишь жгутиконосоцы, представляющие собой минорный компонент исходной инвазии (Малышева, Фролов, 2009).

Похожая, хотя и более запутанная ситуация сложилась с другим видом — *Leptomonas nabiculae*, первоначально описанным в той же работе (Подлипаев, 1985) и из того же хозяина (*Nabis flavomarginatus*). Уже в самой статье упоминается что, клетки в культуре значительно отличались от тех, по которым был охарактеризован вид. Тем не менее культура Д-2 (позднее обозначавшаяся как D2) была названа типовой и использовалась в таком качестве в различных исследованиях с использованием молекулярных маркеров (Kolesnikov et al., 1990; Подлипаев и др., 1991, 1998; Bulat et al., 1999). Судя по результатам анализа с использованием УП-ПЦР, культура D2 имеет сходство с представителями рода *Crithidia* (Подлипаев и др., 1998; Bulat et al., 1999).

А. О. Фролов, полагая, что клетки в культуре D2 не относятся к *L. nabiculae*, в 1991 г. в Псковской обл. выделил из *Nabis flavomarginatus* изолят Nfm2 (позднее обозначавшийся Nfm). Именно этот изолят без указания его названия и использовался в ультраструктурных исследованиях под именем *L. nabiculae* (Фролов, Скарлато, 1995; Шаглина и др., 1995), при этом отождествление Nfm2 с указанным видом никак не было обосновано.

Между тем *L. nabiculae* в понимании Фролова с соавт. имеет особенности, которые значительно отличают его от других хорошо изученных трипаносоматид. Это обстоятельство облегчает идентификацию данного вида в природе. Для этих жгутиконосцев характерно наличие развитого цитостом-цитофарингеального комплекса и локализация на границе пищевода и желудка клопа-хозяина (Фролов, Скарлато, 1995; Шаглина и др., 1995).

Культуру Nfm2 использовали также и в молекулярно-филогенетических исследованиях, где она фигурировала под названием «*Leptomonas* sp. Nfm», без какой-либо ссылки на ультраструктурные исследования *L. nabiculae*. Результаты филогенетического анализа с использованием гена 18S рРНК противоречат положению этого вида, определяемому по гену 5S рРНК. В первом случае «*Leptomonas* sp. Nfm» примыкает к так называемой «медленно эволюционирующей кладе» (Merzlyak et al., 2001), во втором — оказывается среди представителей рода *Herpetomonas* (Podlipaev et al., 2004). Между тем в онлайн-базе данных SILVA rRNA database project (<http://www.arb-silva.de>) последовательность гена 18S рРНК отмечена низким значением параметра *pintail*, что обычно указывает на аномалию сиквенса, которая может быть связана с его химерным происхождением. Сравнение этой последовательности с базой данных Genbank при помощи алгоритма BLAST показывает, что наиболее сходными с ней оказываются сиквенсы гена 18S рРНК представителей рода *Herpetomonas*.

Таким образом, с *Leptomonas nabiculae* сложилась весьма непростая ситуация. Во-первых, под этим названием фигурируют исходный изолят, использовавшийся для описания вида, культура D2 и изолят Nfm2. Во-вторых, в литературе содержатся противоречивые и не вполне достоверные данные о филогенетическом положении культур D2 и Nfm2, которые вызывают сомнения в правильности определения таксономической принадлежности *L. nabiculae*. В связи с этим мы решили провести морфологическое сравнение клеток из всех упомянутых источников друг с другом и с прочими видами трипаносоматид, описанными из клопов сем. Nabidae а также определить филогенетическое положение жгутиконосцев из культур D2 и Nfm2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Аксеничные культуры клеток трипаносоматид Nfm2 и D2, хранящиеся с момента их выделения в банке живых культур Лаборатории протозоологии ЗИН РАН, выращивались на среде ВНИ (Brain Heart Infusion) фирмы Difco с добавлением гемина (25 мкг/мл). Пересевы проводили один раз в месяц с последующей инкубацией в течение 3 сут при температуре 25 °С, после чего культуру жгутиконосцев помещали в холодильник (5 °С). Из культур на разных сроках культивирования изготавливали сухие мазки, которые фиксировали 96%-ным этанолом и затем окрашивали по Романовскому-Гимза (рН 6.8).

Клонирование культуры Nfm2 осуществляли на плотной среде, для этого в приготовленную по стандартной методике среду ВНИ добавляли питательный агар фирмы Difco (2 %) и гемин (25 мкг/мл). 10-дневную культуру жгутиконосцев разводили жидкой средой так, чтобы концентрация клеток

не превышала 5×10^2 кл/мл. Каплю разведенной таким образом культуры наносили на чашку Петри с плотной средой и распределяли при помощи шпателя. Инкубацию производили в термостате при 25 °C в течение 7 дней. Клоны трипаносоматид с твердой среды пересеивали на жидкую и по прошествии 7 дней исследовали на сухих мазках.

Для изучения морфологии жгутиконосцев из кишечника хозяина были использованы хранящиеся в коллекции лаборатории протозоологии Зоологического института РАН препараты № 145 (гапантотип *L. nabiculae*), препарат «Nfm2», а также № 45 и № 46 (синтипы *L. occidentalis*). Исследования мазков были выполнены на микроскопе Leika DME. Микрофотографии получены с использованием телекамеры Panasonic 650 CCTV и системы видеозахвата Asus V3800. Клетки жгутиконосцев измеряли с использованием программы UTHSCSA Image Tool v. 2.0.

Геномную ДНК из клеток культур D2 и Nfm2 выделяли по описанной ранее методике (Aljanabi, Martinez, 1997). Ген 18S рРНК амплифицировали с использованием праймеров UM1 (5'-GTCATATGCTTGTTC AAGGACT-TAG-3') и LM2 (5'- GTTACGACTTTTGCTTCCTCTATTG-3'). ПЦР проводили по следующей схеме: 94 °C — 5', затем 30 циклов 94 °C — 15s, 55 °C — 30", 72 °C — 2' b и заключительная стадия 72 °C — 10'. ПЦР-продукты очищали при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) и секвенировали напрямую с праймерами UM1 и LM2, а также с S757 (5'-TCAGGGGGGAGTACGTTTCGC-3'), A757 (5'-GCGAACGTACTCCCCC-CTGA-3'), 883F (5'-GACTTGAATTAGMAAGCATGGGA-3') и 907R (5'-TC CCATGCTTKCTAATTCAAGTC-3'). Секвенирование проводили с использованием набора ABI Prism Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.1 и генетического анализатора ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Для филогенетического анализа помимо полученных нами последовательностей использовали также сиквенсы из базы GenBank: *Angomonas deanei* (HM593011), *Blastocrithidia triatomae* (AF153037), *Bodo uncinatus* (AF208884), *Crithidia abscondita* (EU079126), *C. bombi* (FN546181) *C. deanei* ATCC 30255 (EU079129), *C. fasciculata* (Y00055), *C. insperata* (EU079125), *C. permixta* (EU079127), *Endotrypanum monterogei* (X53911), *Herpetomonas mariadeanei* (U01013), *H. megaseliae* (U01014), *H. muscarum* (L18872), *H. samuelpeessoai* (U01016), *H. trimorpha* (EU179326), *H. ztiplika* (AF416560), *Leishmania donovani* (GQ332356), *L. major* (GQ332361), *L. tarentolae* (M84225), *Leptomonas collosoma* (JN582046), *L. acus* (DQ910923), *L. barvae* (FJ968532), *L. bifurcate* (DQ910925), *L. cf. lactosovorans* (EU079122), *L. costaricensis* (DQ383648), *L. jaculum* (EF184218), *L. jaderae* (EU079123), *L. neopamerae* (DQ910924), *L. rigidus* (JN582049), *L. podlipaevi* (DQ383649), *L. seymouri* (AF153040), *Leptomonas* sp. Cfm (AF153041), *L. tarcoles* (EF546786), *Parabodo caudatus* (AY028450), *Phytomonas serpens* (AF016320), *Phytomonas* sp. isolate Hartl (L35076), *Sergeia podlipaevi* (DQ394362), *Strigomonas culicis* (U05679), *S. oncopelti* (AF038025), *Trypanoplasma borreli* (L14840), *Trypanosoma brucei* (M12676), *T. cobitis* (AJ009143), *T. cruzi* (FJ900239), *T. mega* (AJ223567), *T. pestanai* (AJ009159), *Trypanosomatidae* gen. sp. Ch10 (GU059569), *Trypanosomatidae* gen. sp. G755 (U59491), *Trypanosomatidae* gen. sp. «strain Eva» (AF071866), *Wallaceina brevicula* (AF153045), *W. inconstans* (AF153044), *Wallaceina podlipaevi* (AF153039), *Wallaceina* sp. Wsd (JN582045).

Последовательности выравнивали при помощи программы Muscle 3.8.31 (Edgar, 2004), затем выравнивание правил вручную с использованием программы Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Ненадежно выровненные позиции были удалены при помощи Gblocks 0.91b (Castresana, 2000) со всеми параметрами по умолчанию, за исключением двух: минимальная длина «блока А» была приравнена к 5, а позиции, в которых более половины последовательностей имели пробелы, подлежали удалению («Allowed Gap Positions» = «With Half»). Полученное выравнивание имело длину в 1977 позиций.

Модель нуклеотидных замен GTR+I+G была выбрана при помощи скорректированного критерия Акаике в программе Jmodeltest 0.1.1 (Posada, 2008). Анализ методом максимального правдоподобия проводили с использованием программы RAxML 7.0.4 (Stamatakis, 2006). Тестирование топологии проводили методом бутстрепа (тщательный вариант RAxML) с использованием 1000 реплик. Реконструкцию филогенетического дерева по методу Байеса осуществляли при помощи программы Mr Bayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) со следующими параметрами: ngen = 5000000, samplefreq = 1000, nucmodel = 4by4, nst = 6, rates = invgamma, ngammacat = 4, burnin = 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

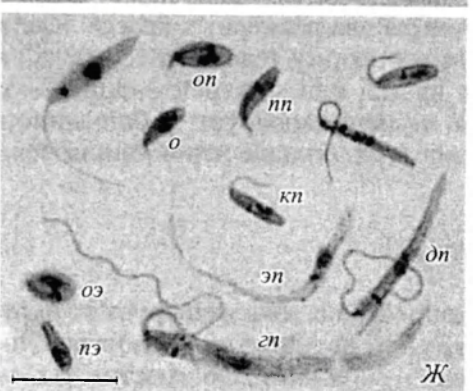
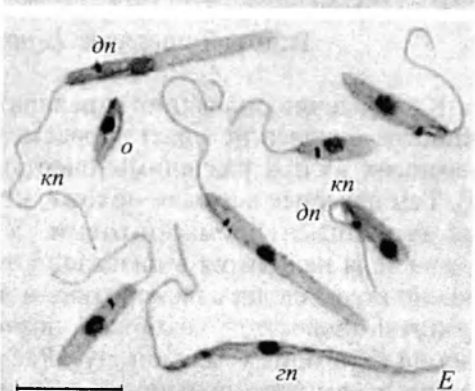
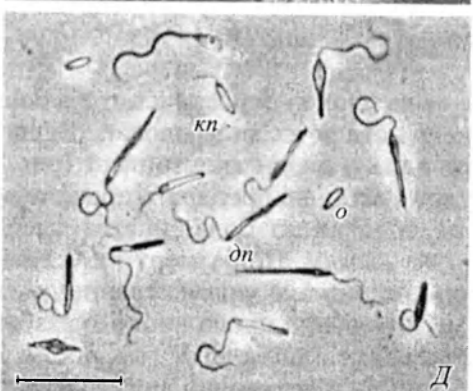
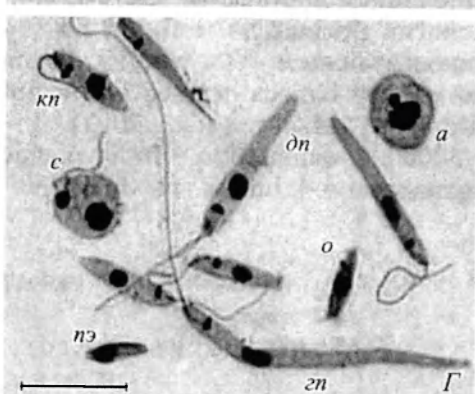
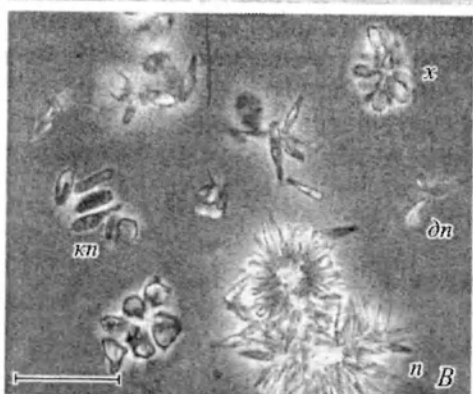
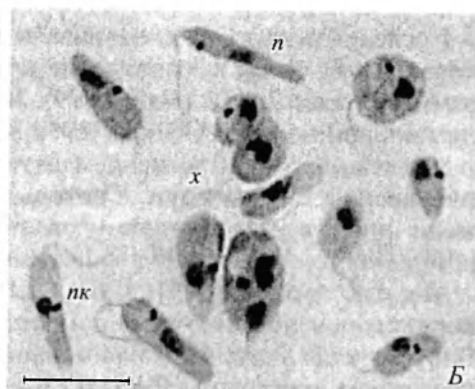
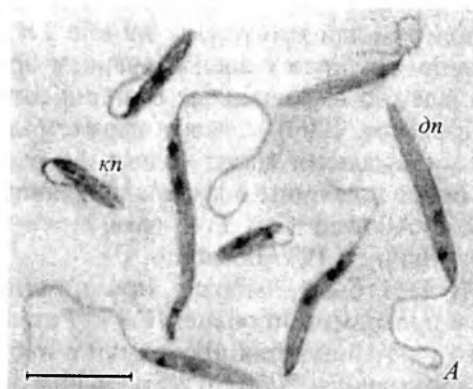
Морфология клеток в исходных изолятах и в культурах

Типовой препарат *Leptomonas nabiculae* (№ 145)

К сожалению, на данном препарате из-за плохой окраски клеток в большинстве случаев не удастся рассмотреть детали их морфологии. Лишь у немногих из них различимы очертания ядра и виден кинетопласт (рис. 1, А). Тем не менее все-таки похоже, что все клетки на препарате представлены типичными промастиготами. У подавляющего большинства клеток длина тела находится в диапазоне от 6 до 22 мкм. По размеру их условно можно подразделить на короткие и длинные, однако четкую границу между ними провести невозможно, поэтому измерения проводили без разбиения на категории (см. таблицу). Распределение длин клеток (см. рис. 2, А) имеет два выраженных пика в районе 9 и 13 мкм, что подкрепляет визуальное впечатление о подразделении клеток на два размерных класса. Клетки имеют цилиндрическую или булавовидную форму тела, некоторые из них изогнуты. Передний конец закруглен, срезан или заострен, задний — закруглен или заострен. Длина жгутика сильно варьирует, у большинства клеток она либо немногим более $\frac{1}{2}$, либо чуть больше целой длины тела.

Культура D2

Форма клеток в культуре весьма разнообразна, она варьирует от округлой до палочковидной (рис. 1, Б). Между тем по длине они довольно однородны (рис. 2, Б). Большая часть клеток — типичные хоаномастиготы: они



имеют короткое тело (округлое, ячменеобразное, кувшиновидное и т. п.), передний конец которого обычно заметно расширен, а также широкий и глубокий жгутиковый карман. Кинетопласт у таких клеток расположен вблизи ядра (спереди, сбоку или немного позади). Остальные клетки представляют формы промежуточные между хоано- и промастиготами. У них более вытянутое тело и предядерное положение кинетопласта. Типичные промастиготы редки.

Жгутик обычно сопоставим по длине с телом клетки, иногда укорочен (менее 1/2 длины тела). Клетки в культуре образуют многочисленные розетковидные ассоциаты (рис. 1, В).

Изолят Nfm2 (мазок из кишечника)

Качество препарата высокое, поэтому у всех клеток можно разглядеть ядро, кинетопласт и жгутик (рис. 1, Г). Премастиготы имеют все те же особенности строения, что были перечислены для таковых на типовом препарате *L. nabiculae*. Они тоже могут быть визуально разделены на короткие и длинные, что подтверждается распределением длин клеток с пиками в районе 8 и 13 мкм (рис. 2, В). Однако на данном мазке присутствует некоторое количество особо длинных клеток (до 45 мкм), которые мы условно обозначили, как гигантские. У некоторых из гигантских клеток тело спирально закручено на 0.5—1.5 оборота. Встречаются скопления клеток, контактирующих друг с другом при помощи жгутиков.

Кроме промастигот на мазке присутствует также небольшое количество описто-, сферо- и амастигот. Опистомастиготы мелкие, по длине примерно соответствуют наиболее коротким промастиготам (см. таблицу), но цитоплазма их часто более интенсивно окрашена, а жгутик укорочен. Амастиготы и сферомастиготы имеют округлую форму, их диаметр 6—7 мкм. Помимо этого на препарате есть немного мелких клеток с интенсивно окрашенным содержимым, которые, по всей видимости, являются эндомастиготами.

Культура Nfm2

Клетки представлены не образующими скоплений промастиготами и опистомастиготами (рис. 1, Д, Е). И те, и другие выглядят точно так же, как и на мазке из кишечника. Между тем гигантские клетки более редки и

Рис. 1. Морфология клеток исследованных культур и изолятов (световой микроскоп).

А — типовой препарат *Leptomonas nabiculae*; Б — мазок из культуры D2; В — общий вид жгутиконосцев в культуре D2 (фазовый контраст); Г — мазок из исходного изолята Nfm2; Д — мазок из культуры Nfm2; Е — общий вид жгутиконосцев в культуре Nfm2 (фазовый контраст); Ж — типовой препарат *L. occidentalis*. а — амастигота; гп — гигантская промастигота; дп — длинная промастигота; кп — короткая промастигота; о — опистомастигота; оп — овальная промастигота; оэ — овальная эндомастигота; п — промастигота; пк — клетки, переходные между хоано- и промастиготой; пп — палочковидная промастигота; пэ — палочковидная эндомастигота; с — сферомастигота; х — хоаномастигота. Масштабные линейки, мкм: А, Б, Г, Д, Ж — 10, В, Е — 20.

Fig. 1. Morphology of the cells of investigated cultures and isolates.

Морфометрические параметры клеток трипаносоматид в кишечнике хозяина
Morphometric parameters of the trypanosomatid cells in the host's intestine

	Значение морфометрических параметров, мкм, $\bar{X} \pm s_x$								
	Дл.	Шир.	Пк-я	Зк-я	Пк-к	Я-к	Дл. я.	Дл. к.	Ж
Промастиготы изолята Nfm2 (n = 88)	13.0 ± 6.9 (6.0—45.5)	1.9 ± 0.3 (1.3—2.8)	5.2 ± 1.3 (2.7—11.2)	7.6 ± 5.0 (2.1—28.3)	1.9 ± 0.4 (1.2—3.2)	1.5 ± 0.9 (0.1—6.0)	2.2 ± 0.4 (1.4—3.1)	1.1 ± 0.2 (0.7—1.5)	14.9 ± 7.6 (4.9—46.9)
Опистомастиготы изолята Nfm2 (n = 5)	5.1 ± 0.7 (4.3—6.1)	1.7 ± 0.4 (1.2—2.1)	3.0 ± 0.5 (2.6—3.6)	2.4 ± 0.7 (1.8—3.4)	3.6 ± 0.9 (3.0—4.2)	0.3 ± 0.3 (0.1—0.5)	1.6 ± 0.3 (1.3—1.8)	1.1 (1.1)	1.0 ± 0.2 (0.8—1.1)
Промастиготы в культуре Nfm2 (n = 78)	11.6 ± 3.7 (5.6—25.6)	1.8 ± 0.3 (1.2—2.6)	5.3 ± 1.4 (2.3—9.6)	6.0 ± 2.8 (1.8—16.0)	2.2 ± 0.4 (1.3—3.5)	1.7 ± 1.1 (0.1—5.0)	2.1 ± 0.3 (1.5—2.7)	0.9 ± 0.2 (0.5—1.3)	15.6 ± 4.7 (4.0—23.8)
Опистомастиготы в культуре Nfm2 (n = 68)	5.0 ± 0.6 (3.6—6.3)	1.5 ± 0.3 (1.0—2.4)	2.1 ± 0.6 (1.4—4.4)	2.9 ± 0.6 (1.4—4.4)	3.6 ± 0.7 (2.3—4.9)	0.8 ± 0.5 (0.0—2.0)	1.7 ± 0.2 (1.2—2.1)	0.7 ± 0.1 (0.5—1.0)	1.9 ± 0.7 (0.8—4.5)
Хоано- и промастиготы в культуре Д-2 (n = 30)	8.6 ± 1.6 (6.1—11.1)	3.0 ± 0.8 (1.6—4.7)	5.2 ± 0.7 (3.5—6.4)	3.4 ± 1.1 (0.9—5.7)	2.5 ± 0.6 (1.3—3.8)	1.4 ± 0.8 (0.4—3.1)	2.0 ± 0.3 (1.5—2.5)	0.9 ± 0.2 (0.7—1.5)	5.2 ± 2.7 (1.6—11.6)
Промастиготы <i>L. nabiculae</i> (n = 91)	13.3 ± 4.2 (6.1—28.5)	1.9 ± 0.3 (1.3—2.8)	—	—	—	—	—	—	14.5 ± 6.4 (5.8—31.7)
Промастиготы <i>L. occidentals</i> (n = 102)	10.5 ± 6.3 (5.4—40.9)	1.6 ± 0.4 (1.0—3.2)	4.9 ± 1.5 (3.4—13.7)	5.6 ± 5.1 (1.6—31.2)	2.4 ± 0.5 (1.6—3.9)	1.4 ± 1.2 (0.0—8.76)	2.3 ± 0.6 (1.2—4.1)	1.0 ± 0.1 (0.6—1.3)	11.1 ± 7.4 (4.0—35.11)
Опистомастиготы <i>L. occidentals</i> (n = 2)	5.0 (4.8—5.3)	2.0 (1.9—2.1)	2.7 (2.7)	2.2 (2.0—2.4)	3.8 (3.7—3.8)	1.3 (1.2—1.3)	1.3 (1.2—1.4)	0.9 (0.9)	1.2 (0.71—1—7)
Промастиготы <i>L. peterhoffi</i> (n = 66)	12.9 ± 4.4 (5.8—24.12)	2.0 ± 0.5 (1.2—3.6)	5.2 ± 1.4 (2.8—8.6)	5.9 ± 4.0 (1.2—15.2)	2.9 ± 0.6 (1.7—4.4)	1.5 ± 0.8 (0.3—3.8)	2.2 ± 0.5 (1.0—3.5)	0.9 ± 0.2 (0.6—1.3)	18.5 ± 11.9 (4.6—40.5)

Примечание. В скобках указаны максимальные и минимальные значения величин. Дл. — общая длина клетки без жгутика, Шир. — ширина клетки в районе ядра, Пк-к — расстояние от переднего конца клетки до кинетопласта, Пк-я — расстояние от переднего конца клетки до центра ядра, Зк-я — расстояние от заднего конца клетки до центра ядра, Я-к — расстояние от края ядра до кинетопласта, Дл. я. — длина ядра, Дл. к. — длина кинетопласта, Ж — длина жгутика.

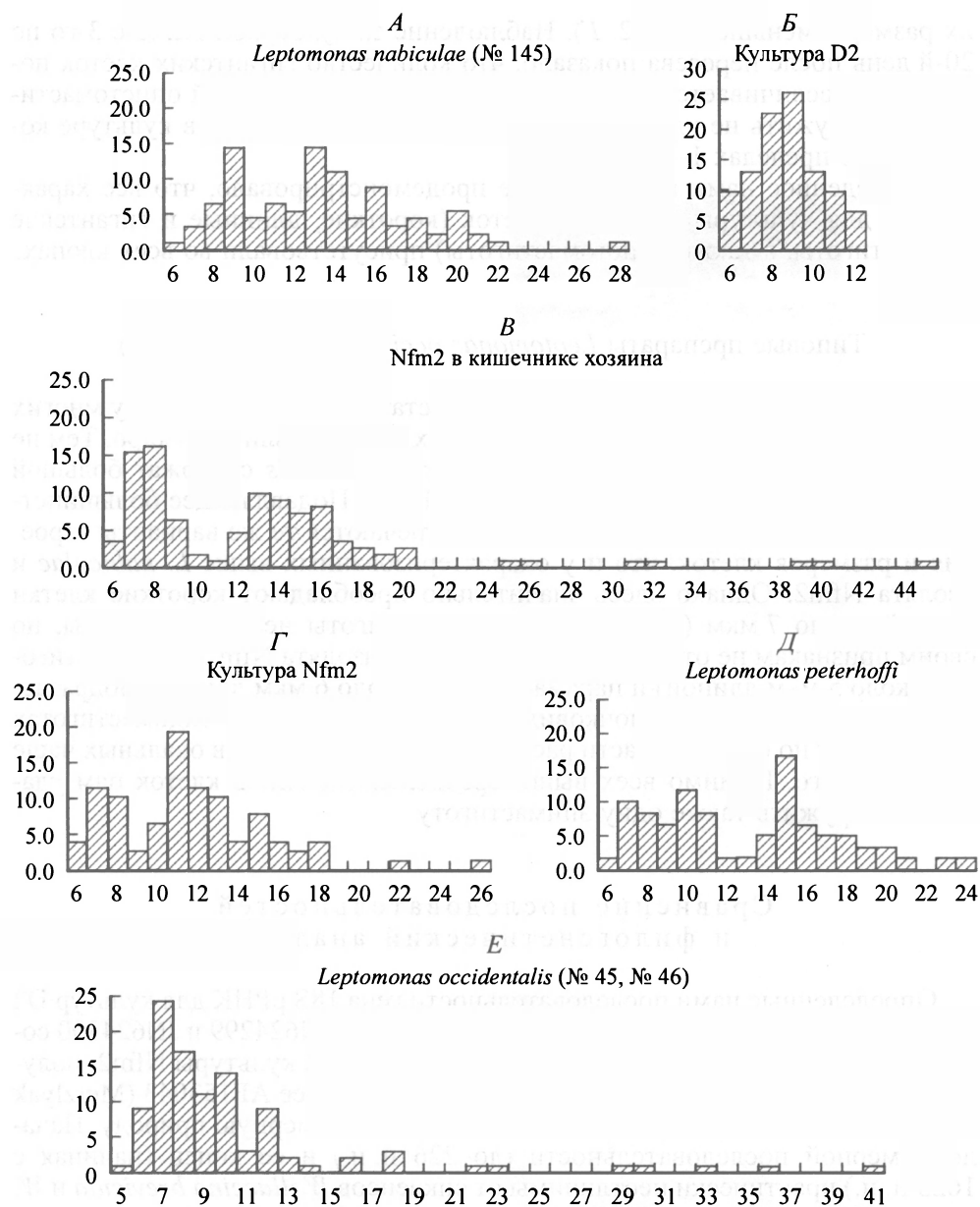


Рис. 2. Распределения длин клеток исследованных культур и изолятов.
 А — типовой препарат *Leptomonas nabiculae*; Б — культура D2; В — исходный изолят Nfm2 (мазок из кишечника); Г — культура Nfm2; Д — типовой препарат *L. peterhoffi* (по: Малышева, Фролов, 2009); Е — синтипы *L. occidentalis*. По оси абсцисс — длина (мкм), по оси ординат — доля клеток (%).

Fig. 1. Distribution of the cell lengths in studied cultures and isolates.

их размеры меньше (рис. 2, Г). Наблюдение за культурой Nfm2 с 3-го по 20-й день после пересева показало, что количество гигантских клеток постепенно увеличивается. При этом в течение первых 5 дней опистомастиготы обнаружить не удастся, впоследствии их содержание в культуре колеблется в пределах 1—4 %.

Проведенное нами клонирование продемонстрировало, что все характерные для культуры варианты клеток (короткие, длинные и гигантские промастиготы, а также опистомастиготы) присутствовали во всех клонах.

Типовые препараты *Leptomonas occidentalis* (№ 45, № 46)

К сожалению, окраска препаратов недостаточно качественная: у многих клеток плохо окрашен жгутик, у некоторых трудноразличимо ядро. Тем не менее очевидно, что синтипы *Leptomonas occidentalis* содержат большой набор самых разнообразных клеток (рис. 1, Ж). Подавляющее большинство из них — промастиготы, у которых встречаются те же варианты строения и размеров клеток, что и у охарактеризованных выше *L. nabiculae* и изолята Nfm2. Однако здесь значительно преобладают короткие клетки длиной около 7 мкм (рис. 2, Е). Опистомастиготы немногочисленны, по своим признакам не отличаются от таковых у изолята Nfm2. Эндомастиготы (около 5 мкм длиной) и парамастиготы (около 6 мкм длиной) подразделяются на овальные и палочковидные. В палочковидных эндомастиготах кинетопласт по большей части расположен позади ядра, а в овальных чаще сбоку от него. Помимо всех вышеперечисленных типов клеток нам удалось обнаружить также одну эпимастиготу.

Сравнение последовательностей и филогенетический анализ

Определенные нами последовательности гена 18S рРНК для культур D2 и Nfm2 были помещены в Genbank под номерами JN624299 и JN624300 соответственно. Сравнение сиквенса данного гена для культуры Nfm2, полученного в настоящей работе, с опубликованным ранее AF153043 (Merzlyak et al., 2001) показало, что последний имеет явно химерную природу. Начало химерной последовательности (до 226 п. н.) и ее конец (начиная с 1623 п. н.) практически неотличимы от сиквенсов *Wallaceina brevicula* и *W. inconstans* (AF153044, AF153045), но в то же время отличаются от полученной нами. В средней части (397—1353 п. н.) оба сиквенса Nfm2 одинаковы, но отличаются от таковых у *Wallaceina*. Остальные фрагменты последовательности AF153043 являются консервативными для всех четырех сиквенсов.

Филогенетические деревья, реконструированные методами Байеса и максимальной экономии, были топологически одинаковыми. За исключением группировок с низкой статистической поддержкой результаты проведенного нами филогенетического анализа по гену 18S рРНК (рис. 3) весьма похожи на те, что были опубликованы ранее (например Merzlyak et al., 2001; Zidkova et al., 2010).

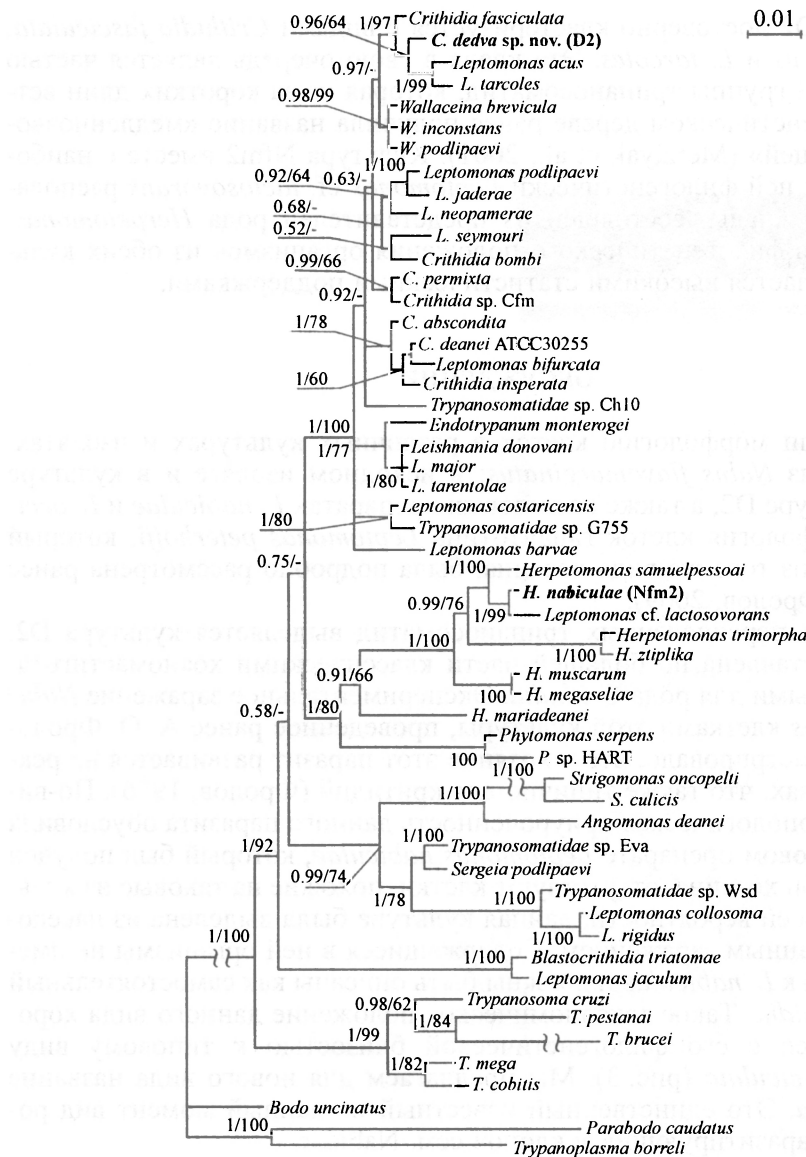


Рис. 3. Филогенетическое древо трипаносоматид, реконструированное по гену 18S рРНК с использованием метода Байеса.

Числа в узлах обозначают Байесовы апостериорные вероятности и проценты бутстрепа (RAxML) соответственно. Значения менее 0.5 или 50 % соответственно обозначены прочерком. Длины ветвей даны в пропорции к количеству замен; у ветвей, перечеркнутых двойной чертой, длина сокращена вдвое. Масштабная линейка соответствует количеству замен на сайт. Виды, культуры которых исследованы в настоящей работе, обозначены полужирным шрифтом.

Fig. 3 18S rRNA phylogenetic tree of trypanosomatids inferred using Bayesian approach.

Культура D2 достоверно кластеризуется с видами *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas acus* и *L. tarcoles*. Эта клада в свою очередь является частью более крупной группы трипаносоматид, которая из-за коротких длин ветвей на филогенетическом дереве ранее получила название «медленноэволюционирующей» (Merzlyak et al., 2001). Культура Nfm2 вместе с наиболее близким к ней филогенетически *Leptomonas* cf. *lactosovorans* располагается внутри клады, состоящей из представителей рода *Herpetomonas*. Достоверность филогенетического положения организмов из обеих культур подтверждается высокими статистическими поддержками.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучили морфологию клеток в различных культурах и изолятах, выделенных из *Nabis flavomarginatus*: в исходном изоляте и в культуре Nfm2, в культуре D2, а также на типовых препаратах *L. nabiculae* и *L. occidentalis*. Морфология клеток гапантотипа *Leptomonas peterhoffi*, который был выделен из того же вида хозяина, была подробно рассмотрена ранее (Малышева, Фролов, 2009).

Среди всех перечисленных трипаносоматид выделяется культура D2, которая представлена по большей части классическими хоаномастиготами, характерными для рода *Crithidia*. Экспериментальное заражение *Nabis flavomarginatus* клетками этой культуры, проведенное ранее А. О. Фроловым, продемонстрировало, что в хозяине этот паразит развивается на ректальных железах, что также типично для критидий (Фролов, 1986). По-видимому, эта топологическая приуроченность данного паразита обусловила то, что на типовом препарате *Leptomonas nabiculae*, который был получен от той же особи хозяина, отсутствуют клетки, похожие на таковые из культуры D2. По всей вероятности, данная культура была выделена из насекомого со смешанным заражением. Содержащиеся в ней организмы не имеют отношения к *L. nabiculae* и должны быть описаны как самостоятельный вид рода *Crithidia*. Такое таксономическое положение данного вида хорошо согласуется с его филогенетической близостью к типовому виду рода — *C. fasciculata* (рис. 3). Мы предлагаем для нового вида название *Crithidia dedva*. Это единственный известный на данный момент вид рода *Crithidia*, паразитирующий у клопов сем. Nabidae.

Crithidia dedva sp. nov.

Хозяин: *Nabis flavomarginatus* Scholtz, 1847 (Heteroptera: Nabidae).

Терра типика: Старый Петергоф, Санкт-Петербург, Россия.

Гапантотип: культура D2 (Д-2), выделенная в 1982 г. С. А. Подлипаевым. Хранится в коллекции живых культур Лаборатории протозоологии ЗИН РАН.

Этимология: видовое название соответствует прочтению первоначального обозначения культуры по-русски (Д-2: де-два).

Диагноз: в жизненном цикле присутствуют типичные хоаномастиготы, короткие промастиготы и переходные варианты между ними, рассели-

тельная стадия представлена эндомастиготами. Размеры подвижных клеток: длина 6.1—11.1 мкм, ширина 1.6—4.7 мкм. Этот вид может быть идентифицирован по последовательности 18S рРНК (номер JN624299 в базе Genbank).

Все три вида рода *Leptomonas*, описанные из *Nabis flavomarginatus* (*L. nabiculae*, *L. peterhoffi* и *L. occidentalis*), а также изолят Nfm2, характеризуются наличием сходного спектра изменчивости промастигот как по форме, так и по размеру. Для всех этих трипаносоматид характерно присутствие трех условных размерных категорий промастигот: коротких (6—10 мкм), длинных (11—22 мкм) и гигантских (более 22 мкм). Проведенный нами эксперимент по клонированию культуры Nfm2 рассеял сомнения относительно того, что столь разные по длине клетки могут принадлежать к одному виду. Прежде наличие разных размерных категорий в жизненном цикле было продемонстрировано у *Herpetomonas muscarum* и *H. trimorpha* (Rogers, Wallace, 1971; Zidkova et al., 2010).

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

На гапантотипах *Leptomonas peterhoffi* и *L. occidentalis* помимо палочковидных эндомастигот, близких по размеру к опистомастиготам, есть еще и овальные. Их присутствие на типовом препарате *Leptomonas peterhoffi*, как было показано ранее, объясняется присутствием еще одного вида — *Wallaceina podlipaevi* (Малышева, Фролов, 2009). То же самое, по-видимому, справедливо и для типового препарата *L. occidentalis* с тем лишь отличием, что мы не знаем, какой в данном случае вид оказался сопутствующим. Культура, выделенная при описании этого вида, тоже содержала клетки, отличные от тех, что использовались при составлении диагноза. Однако она, к сожалению, не сохранилась.

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

Herpetomonas nabiculae comb. nov.

Синонимы: *Leptomonas nabiculae* Podlipaev 1985, *L. peterhoffi* Podlipaev 1985, *L. occidentalis* Podlipaev 1985, «*Leptomonas* sp. Nfm».

Хозяин: *Nabis flavomarginatus* Scholtz, 1847 (Heteroptera: Nabidae).

Terra typica: Старый Петергоф, Санкт-Петербург, Россия.

Гапантотип: препарат № 145, сделанный в 1982 г. С. А. Подлипаевым. Хранится в коллекции типовых препаратов Лаборатории протозоологии ЗИН РАН.

Диагноз: подвижные клетки представлены промастиготами, сильно варьирующими по длине (5.4—45.5 мкм) и опистомастиготами (3.6—6.3 мкм). Характерной особенностью данного вида является обитание на границе пищевода и желудка хозяина, а также хорошо развитый цитостом-цитофарингеальный комплекс. Этот вид может быть идентифицирован по последовательности 18S рРНК (номер JN624300 в базе Genbank).

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

Список литературы

- Костыгов А. Ю., Фролов А. О. 2007. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock, 1914: лептомонас или бластокритидия? Паразитология. 41 (2): 126—136.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. 2009. Проблема идентификации культур гомоксенных трипаносоматид и описание нового вида *Wallaceina podlipaevi* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Паразитология. 43 (6): 502—515.
- Подлипаев С. А. 1985. Новые виды низших трипаносоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории. Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 129: 35—47.
- Подлипаев С. А., Мокроусов И. В., Булат. С. А. 1998. К молекулярной геносистематике трипаносоматид из насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР). Паразитология. 32 (4): 317—326.
- Подлипаев С. А., Филатов М. В., Пантина Р. А. 1991. Сравнительное определение количества ДНК и молекулярные кариотипы у низших трипаносоматид из клопов Северо-Запада СССР. Паразитология. 25 (3): 250—257.
- Фролов А. О. 1986. Жизненный цикл *Leptomonas nabiculae* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) в клопах *Nabica flavomarginata* (Hemiptera, Nabidae). Матер. 10-й конф. Укр. общ-ва паразитологов. 2. Киев: Наукова думка. 289 с.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. 1995. Тонкое строение и механизмы адаптации низших трипаносоматид в полужесткокрылых насекомых. Цитология. 37 (7): 539—560.

- Шаглина Е. Г., Фролов А. О., Скарлато С. О. 1995. Ультраструктура паразитического жгутиконосца *Leptomonas nabiculae* из клопа *Nabica flavomarginata*. Цитология. 37 (1—2): 159—165.
- Aljanabi S. M., Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucl. Acids Res. 25 (22): 4692—4693.
- Bulat S. A., Mokrousov I. V., Podlipaev S. A. 1999. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. Europ. Journ. Protistol. 35: 319—327.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol. Biol. Evol. 17: 540—552.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl. Acids Res. 32 (5): 1792—1797.
- Freymuller E., Camargo P. 1981. Ultrastructural differences between species with and without symbionts. Journ. Protozool. 28 (2): 175—182.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. 41: 95—98.
- Hoare G. A., Wallace F. G. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature. 212: 1385 — 1386.
- Hollar L., Lukes J., Maslov D. A. 1998. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. Journ. Eukaryot. Microbiol. 45 (3): 293—297.
- Kolesnikov A. A., Maslov D. A., Podlipaev S. A. 1990. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR. Arch Protistenk 138: 239—250.
- Manai A. D. C., Souza M. D. C. M. D., Lustosa E. D. S., Roitman I. 1981. *Leptomonas lactosovorans* n. sp., a Lactose-Utilizing Trypanosomatid: Description and Nutritional Requirements. Journ. Eukaryot. Microbiol. 28: 124—126.
- Merzlyak E., Yurchenko V., Kolesnikov A. A., Alexandrov K., Podlipaev S. A., Maslov D. A. 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. Journ. Eukaryot. Microbiol. 48 (2): 161—169.
- Podlipaev S. A., Sturm N. R., Fiala I., Fernandes O., Westenberger S. J., Dollet M., Campbell D. A., Lukes J. 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. Journ. Eukaryot. Microbiol. 51 (3): 283—290.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25: 1253—1256.
- Rogers W. E., Wallace F. G. 1971. Two New Subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880. Journ. Eukaryot. Microbiol. 18: 645—649.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19: 1572—1574.
- Sousa M. A., Santos S. M., Sa-Xavier C., Branco D. C. B. 1998. Cellular differentiation and growth in axenic culture of trypanosomatids allocated in the genus *Leptomonas* (Protozoa: Kinetoplastida). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93 (suppl.2): 100 p.
- Stamatakis A. 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 22 (21): 2688—2690.
- Vickerman K. 1976. The diversity of kinetoplastid flagellates. In: Biology of Kinetoplastida. Eds: Lumsden W. H. R., Evans D. A. London : Academic press. 1: 1—34.
- Zidkova L., Cepicka I., Votypka J., Svobodova M. 2010. *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol. 60 (9): 2236—2246.

INVESTIGATION OF CAUSES OF THE CONFLICT BETWEEN TAXONOMY
AND MOLECULAR PHYLOGENY OF TRYPANOSOMATIDS
BY THE EXAMPLE OF LEPTOMONAS NABICULAE PODLIPAEV, 1987

A. Yu. Kostygov, M. N. Malysheva, A. O. Frolov

Key words: *Leptomonas*, *Herpetomonas nabiculae*, *Crithidia dedva*, mixed infection, molecular phylogeny.

SUMMARY

Results of study of *Leptomonas nabiculae* using various molecular markers and different material (cultures D2 et Nfm2) contradicted each other and taxonomic position of this species. We investigated morphology of the cells in these cultures as well as in hapantotype of *L. nabiculae* and those of *L. peterhoffi* and *L. occidentalis* that had been described from the same host species. We also reconstructed 18S rRNA gene phylogeny using sequences from both cultures. The D2 culture according to its morphology and phylogenetic position revealed to be a *Crithidia* that had accompanied *L. nabiculae* in a mixed infection. We named it *Crithidia dedva*. The cells in the hapantotypes of the three *Leptomonas* species and those of the Nfm2 culture represent a single species that is a *Herpetomonas* (*H. nabiculae*) judging by morphology and molecular phylogeny. We also showed that the sequence of 18S rRNA gene that had been formerly determined represents a chimaera. This had resulted in the wrong position of this species on the phylogenetic tree that had contradicted results of the analysis of 5s rRNA gene.