

УДК 567.893.161.13

**ФИЛОГЕНИЯ ТРИПАНОСОМАТИД: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ
И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОДЫ**

© С. А. Подлипаев, А. О. Фролов

В статье приводятся данные по сравнению двух филогений трипаносоматид, полученных на основе компьютерной обработки морфологических и молекулярных признаков. Основная топология обеих дендрограмм очень схожа. В основании схем располагаются представители рода *Trypanosoma*. Хорошо согласуется на обеих схемах монофилия рода *Wallaceina*. Оба метода, однако, подтверждают гипотезу авторов о сборном характере некоторых родов трипаносоматид, в частности *Leptomonas*, *Crithidia* и *Herpetomonas*. Группа цистообразующих трипаносоматид, объединяющая ряд представителей *Leptomonas* и *Blastocrithidia*, формирует монофилетический клад, который, вероятно, представляет самостоятельный род гоноксенных трипаносоматид из насекомых. В статье обсуждаются вероятные причины несоответствия позиционирования некоторых групп трипаносоматид на морфологических и молекулярных филогениях.

Среди других протистов трипаносоматиды выделяются крайней бедностью морфологических информативных признаков, которые могут использоваться для таксономических и филогенетических построений. В период светооптических исследований лишь самые общие характеристики клетки, определяемые ее формой и взаимным расположением в ней ядра и кинетопласта, позволили выделить морфологические формы, или морфотипы, положенные в основу классификации этих жгутиконосцев (Hoare, Wallace, 1966; Baker, 1974; Фролов, 1994). Теперь, однако, совершенно ясно, что такие признаки трипаносоматид весьма изменчивы и не могут использоваться как дискретные характеристики в таксономических и филогенетических исследованиях (Podlipaev e. a., 1991; Подлипаев и др., 1998, и др.).

Применение электронного микроскопа революционизировало представления о протистах, продемонстрировав приложимость принципов сравнительной анатомии на субклеточном уровне (Vickerman, 1994), что привело к кардинальным изменениям взглядов на филогению и макросистему простейших в течение последних двух десятилетий. Масштаб этих изменений, пожалуй, не сравним ни с какими другими перестройками систем в истории зоологии. Было продемонстрировано наличие различных планов строения среди одноклеточных организмов, что привело к повышению таксономического статуса Protozoa до ранга царства и к установлению многочисленных таксонов уровня типа в его новых границах. В результате было создано много различных вариантов филогений и макросистем (Крылов и др., 1980; Corliss, 1984; Серавин, 1984; Старобогатов, 1986; Карпов, 1990; Cavalier-Smith, 1993, и др.). Мы не имеем возможности обсуждать здесь эти системы, тем более что в отношении трипаносоматид все они достаточно единодушны: вместе со свободноживущими бодонидами и паразитическими криптобиями трипаносоматид объединяют в подтип Kinetoplastida, который вместе с эвгленовыми жгутиконосцами помещают в тип Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993).

Кинетопластиды представляют собой четко очерченную естественную группу, монофилия которой не вызывает сомнений. Напротив, представления о филогении внутри этой группы до последнего времени оставались чрезвычайно запутаны и ненадежны. Систематика трипаносоматид исключительно консервативна. За более чем полуторавековую историю изучения описано всего 10 их родов, из которых 3 были описаны в XIX веке, 5 — в начале XX, 1 — в 50-х годах нашего столетия и последний был основан в этом десятилетии (Подлипаев, 1990). К настоящему времени известно более 900 находок трипаносоматид на почти полторы тысячи видов животных и растений (Подлипаев, 1990), что в сочетании с очень разным объемом родов (так, например, более 600 находок отнесены к роду *Trypanosoma* и только два вида образуют род *Endotrypanum*) заставляют а priori предположить недостаточность имеющихся родов для адекватного описания разнообразия трипаносоматид. Несмотря на накопленные знания, современная система трипаносоматид продолжает основываться на тех же старых критериях морфотипов и приуроченности к хозяевам (Hoage, Wallace, 1966), которые давно признаны ненадежными (Wallace e. a., 1983, и др.).

Если для многих одноклеточных организмов применение электронной микроскопии с самого начала стало поворотным моментом, кардинально изменившим представления об их строении, эволюции, филогении и в конечном итоге об их месте в системе, то для трипаносоматид (да и кинетопластид вообще) период накопления и анализа ультраструктурных данных растянулся на 10-летия. Только в начале 90-х годов классическая гипотеза происхождения и эволюции трипаносоматид (Legey, 1904) начала сдавать свои позиции под давлением новых фактов, полученных независимо в ходе сравнительно-морфологических (Фролов, 1993) и молекулярно-биологических исследований (см. обзоры: Philippe, 1998; Vickerman, 1994). Однако результаты морфологических и молекулярных подходов до сих пор рассматриваются независимо друг от друга.

Целью настоящего исследования является сравнение основных кластеров на дендрограммах, независимо построенных с использованием молекулярных и ультраструктурных признаков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Одной из проблем, сдерживающей исследования трипаносоматид, является небольшой и однообразный набор культур этих протистов. В лабораториях мира в настоящее время исследуется около 20—30 изолятов гомоксенных трипаносоматид, из них чаще всего используется 10—15. 15 лет назад число исследовавшихся культур не превышало 10 (Wallace e. a., 1983). Очевидно, что столь ограниченный и однообразный набор изолятов не может адекватно представлять разнообразие более чем 300 описанных видов и находок трипаносоматид насекомых (Подлипаев, 1990).

В настоящем исследовании мы использовали культуры трипаносоматид, выделенные авторами по оригинальным методикам (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987) из полужесткокрылых насекомых Северо-Запада России (см. таблицу). Достоинствами этой коллекции являются четко документированная история лабораторных изолятов и их комплексная изученность разными методами как морфологическими (Подлипаев, 1985; Подлипаев и др., 1990; Фролов, 1994; Frolov, Kaprov, 1995, и др.), так и молекулярными (Kolesnikov e. a., 1990; Bulat e. a., 1999; Марахова и др., 1991; Подлипаев, Рокицкая, 1999; Подлипаев и др., 1998; Скарлато и др., 1998).

Для компьютерного анализа морфологических признаков использовались программы оценки дискретных (0—1) их состояний из пакета Phylip 3.5 (Felsenstein, 1993). Результаты такого рода обработки результатов в значительной степени зависят от качества и количества вводимых признаков. Мы использовали 47 признаков, отображенных по следующим критериям: признак должен быть исследован у большинства анализируемых видов, состояние признака может быть оценено путем введения дискретных данных. В результате мы использовали 33 признака, характеризующих

Список изолятов кинетопластид, использованных в работе

Название изолята	Место и время выделения изолята	Хозяин	Кто выделил или откуда получен изолят
Сем. Bodonidae			
<i>Bodo saltans</i>	Ленинградская обл., 1995	Свободноживущий	А. О. Фролов
Сем. Trypanosomatidae Doflein, 1901			
<i>Blastocrithidia</i> Laird, 1959			
<i>Blastocrithidia gerricola</i> KVI Podlipaev, 1985	Калининградская обл., 1981	<i>Gerris lacustris</i>	С. А. Подлипаев
<i>Blastocrithidia miridarum</i> ZM Podlipaev et Frolov, 1987	Псковская обл., 1984	<i>Lygocoris lucorum</i>	А. О. Фролов
<i>Crithidia</i> Leger, 1902			
<i>Crithidia fasciculata</i> Leger, 1902	?	?	Получен от проф. А. А. Колесникова, МГУ
<i>Crithidia</i> sp. C4	Ленинградская обл., 1987	<i>Gerris rufoscutellatus</i>	С. А. Подлипаев
<i>Herpetomonas</i> Kent, 1880			
<i>Herpetomonas muscarum</i> (Leidy, 1856)	?	<i>Musca domestica</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California — Riverside, США
<i>Herpetomonas pessoai</i> (Galvao, Oliveira, Carvalho et Veiga, 1970)*	Бразилия, 1970	<i>Zelus leucogrammus</i>	Получен от Dr. D. Maslov, University of California — Riverside, США
<i>Herpetomonas</i> sp. ТррХ	Чехия, 1996	<i>Musca domestica</i>	Получен от Dr. J. Lukas, Институт паразитологии Чехии
<i>Leishmania</i> Ross, 1903			
<i>Leishmania tarentolae</i> Wenyon, 1921	?	<i>Tarentola mauritanica</i>	Получен от Dr. D. Maslov, University of California — Riverside, США
<i>Leptomomas</i> Kent, 1880			
<i>Leptomomas collosoma</i> Wallace, Clark, Dyer et Collins, 1960	США, 1960	<i>Gerris dissortis</i>	Получен от Dr. D. Maslov, University of California — Riverside, США
<i>Leptomomas nabiculae</i> D2 Podlipaev, 1985	Ленинградская обл., 1982	<i>Nabicula flavomarginata</i>	С. А. Подлипаев
<i>Leptomomas peterhoffi</i> 101 Podlipaev, 1985	Ленинградская обл., 1982	<i>Nabicula flavomarginata</i>	С. А. Подлипаев
<i>Leptomomas</i> sp. P	Ленинградская обл., 1988	<i>Panorpa communis</i>	С. А. Подлипаев
<i>Leptomomas</i> sp. Nfm	Псковская обл., 1991	<i>Nabicula flavomarginata</i>	А. О. Фролов

Таблица (продолжение)

Название изолята	Место и время выделения изолята	Хозяин	Кто выделил или откуда получен изолят
<i>Phytomonas</i> (Lafont, 1909)			
<i>Phytomonas serpens</i> 1G (Gibbs, 1957)	Бразилия, (Jankevicius e. a., 1989)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Получен от Dr. D. Maslov, University of California — Riverside, США
<i>Phytomonas</i> sp. Hart1	Французская Гайана, 1986 г.	<i>Cocos nucifera</i>	Получен от проф. M. Dollet, CIRAD-CP, Монпелье, Франция
<i>Phytomonas</i> sp. EM1	Франция, окр. Монпелье, 1980 г.	<i>Euphorbia pinea</i>	Получен от проф. M. Dollet, CIRAD-CP, Монпелье, Франция
<i>Wallaceina</i> Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1999 (замещающее название для <i>Proteomonas</i> Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990; см.: Подлипаев, Рокицкая, 1999)			
<i>Wallaceina inconstans</i> ZK (Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990)	Псковская обл., 1986	<i>Calocoris sexguttatus</i>	А. О. Фролов
<i>Wallaceina brevicula</i> NBГ (Frolov et Malysheva, 1989)	Псковская обл., 1986	<i>Nabis brevis</i>	А. О. Фролов

Примечание. * *Herpetomonas pessoai* (Galvao, Oliveira, Carvalho et Veiga, 1970) во многих публикациях обозначается как *Herpetomonas samuelpessoai* Roitman, Brener, Roitman et Kitajima, 1976, что является некорректным с точки зрения зоологической номенклатуры (Levine, 1978; Подлипаев, 1990).

ультратонкую организацию кинетопластид, 6 морфологических характеристик, доступных на светооптическом уровне, и 8 биологических параметров. В первой группе представлены все основные ультраструктурные признаки клеток трипаносоматид (Frolov, Kargov, 1995). Среди морфологических признаков, доступных на светооптическом уровне, мы рассматривали такие, как количество жгутиков, наличие ундулирующей мембраны, расположение кинетопласта относительно ядра, способность к формированию стадий, лишенных жгутика (амастигот). Группа биологических признаков объединила те из них, которые характеризуют образ жизни и среду обитания организма.

Преимущества использования полимеразной цепной реакции с универсальным праймером (УП-ПЦР) и перекрестной гибридизации продуктов ПЦР, а также методы получения данных и обработки материала для построения дендрограммы дистанций описаны ранее (Подлипаев и др., 1998; Podlipaev, Bulat, 1998; Bulat e. a., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основании укорененного по *Bodo caudatus* древа (рис. 1) находятся свободноживущие *Bodo*. Следующий уровень различий демонстрирует дивергенцию двух основных «ветвей» паразитических кинетопластид: трипаноплазменной (кровепаразитические криптобии) и трипаносомной (трипаносомы). Этот уровень, соответствующий дивергенции двужгутиковых и одножгутиковых кинетопластид, указывает на древность кровепаразитизма в эволюции кинетопластид. 4 вида трипаносом, использованных в данной работе, формируют хорошо выраженный клад, что соответствует молекулярным филогениям по гену малой субъединицы рибосомной РНК (Philippe, 1998).

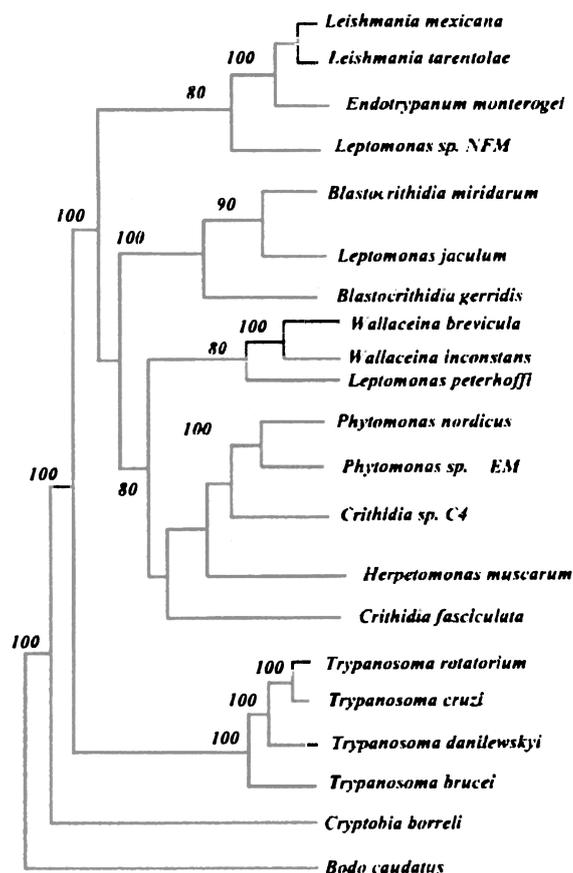


Рис. 1. Максимально согласованная модель филогенетического дерева кинетопластид, построенная с использованием алгоритма Penny Camin Sokal parsimony v. 3.5c. Дерево укоренено по признакам свободноживущего жгутиконосца *Bodo caudatus* (по: Фролову, 1997, с изменениями).

Fig. 1. Phylogenetical tree of Kinetoplastids produced by Penny Sokal parsimonia algorithm, *Bodo caudatus* root, majority-rule and strict consensus tree program, v. 3.5c.

В кроне морфологического дерева трипаносоматид мы обнаруживаем те самые группы жгутиконосцев, которые еще недавно (Baker, 1974) располагались в его основании. Среди гетероксенных трипаносоматид — это *Leishmania* и *Endotrypanum*, паразитирующие в форменных элементах крови позвоночных и использующие в качестве переносчиков москитов, и паразиты растений — *Phytomonas*, использующие как переносчиков растительноядных клопов. Лейшмании и эндотрипанум формируют обособленный от остальных трипаносоматид клад, вероятнее всего, характеризующийся монофилетическим происхождением. В эту группу попадает гомоксенный *Leptomonas* sp. Nfm.

Все остальные позиции в кроне филогенетического дерева трипаносоматид заняты гомоксенными паразитами насекомых. На молекулярном древе эти жгутиконосцы формируют как минимум 3 самостоятельных клада, в которых объединены представители разных родов гомоксенных трипаносоматид (рис. 1, 2).

Как уже отмечалось выше, компьютерная интерпретация ультраструктурных данных в значительной степени совпадает с филогенетическими реконструкциями, выполненными на основании структуры генов рибосомальной РНК (рРНК). Наиболее существенны два расхождения. Первое — терминальное положение *Leishmania* на морфологическом древе (рис. 1), в то время как на рРНК-филогениях лейшмании

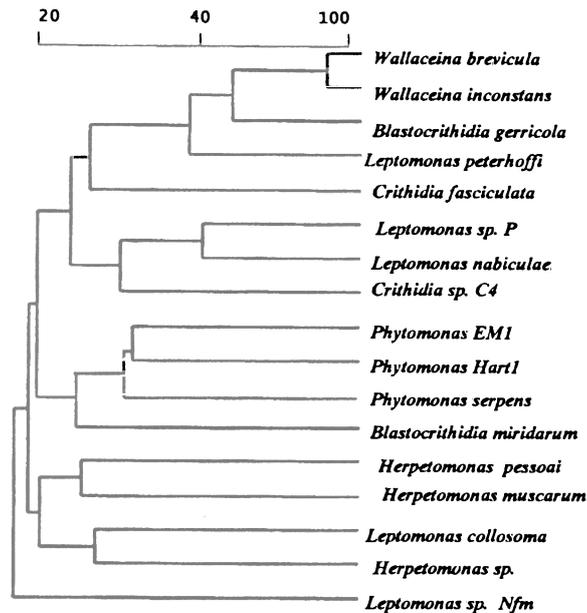


Рис. 2. Дендрограмма различий трипаносоматид на основе УП-ПЦР (полимеразной цепной реакции с универсальным праймером) полиморфизмов (коэффициент Dice's, UPGMA) (по: Подлипаев и др., 1998, с изменениями).

Fig. 2. Dendrogramme of the differences among trypanosomatids from insects and plants constructed on the base of the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products.

хотя и находятся в кроне дерева, но никогда не являются терминальной группой; и второе — близость *Crithidia fasciculata* к ветви *Phytomonas* по морфологическим данным (рис. 1), не находящая подтверждения на молекулярных филогениях (Hollar, Maslov, 1997; Hollar e. a., 1998) (рис. 2).

Более подробно мы сравним положение оригинальных изолятов из клопов Северо-Запада России на морфологической и УП-ПЦР дендрограммах (рис. 1, 2). Первое, что бросается в глаза, — различия в позиции *Leptomonas sp. Nfm*. По морфологическим признакам этот изолят входит в терминальный кластер *Leishmania—Endotrypanum*. По данным УП-ПЦР, *Leptomonas sp. Nfm* максимально удален от всех других исследованных трипаносоматид из насекомых. Столь же обособленную позицию этот изолят занимает и по данным ПЦР со случайными праймерами (Подлипаев, Баньюльс, Долле, неопубликованные данные).

По ультраструктурным признакам *Leptomonas sp. Nfm* отличается от всех исследованных гомоксенных трипаносоматид и фитомонасов наличием развитого цитостом-цитофарингеального комплекса. Цитостом открывается в жгутиковый карман в передней его трети, цитофаринкс идет вдоль стенки кармана до уровня его дна (рис. 3, 1). Такие ротовые аппараты описаны только у трипаносом рыб и *Trypanosoma cruzi*, относящихся к примитивным трипаносомам (Фролов, 1993; Frolov, Каргов, 1995). Другая особенность *Leptomonas sp. Nfm* — размножение на эктодермальной выстилке передней кишки насекомого (Фролов, Скарлато, 1995), что отмечено только при развитии некоторых лейшманий в переносчиках (Molyneux, Ashford, 1983). Таким образом, качественная оценка особенностей ультраструктуры этого изолята скорее соответствует выводам по данным УП-ПЦР (рис. 2), чем результатам нумерического анализа совокупности немолекулярных признаков (рис. 1). Вероятно, тесная связь *Leptomonas sp. Nfm* с лейшманиями и его расположение в терминальной части кроны на немолекулярной дендрограмме является артефактом, связанным с основным

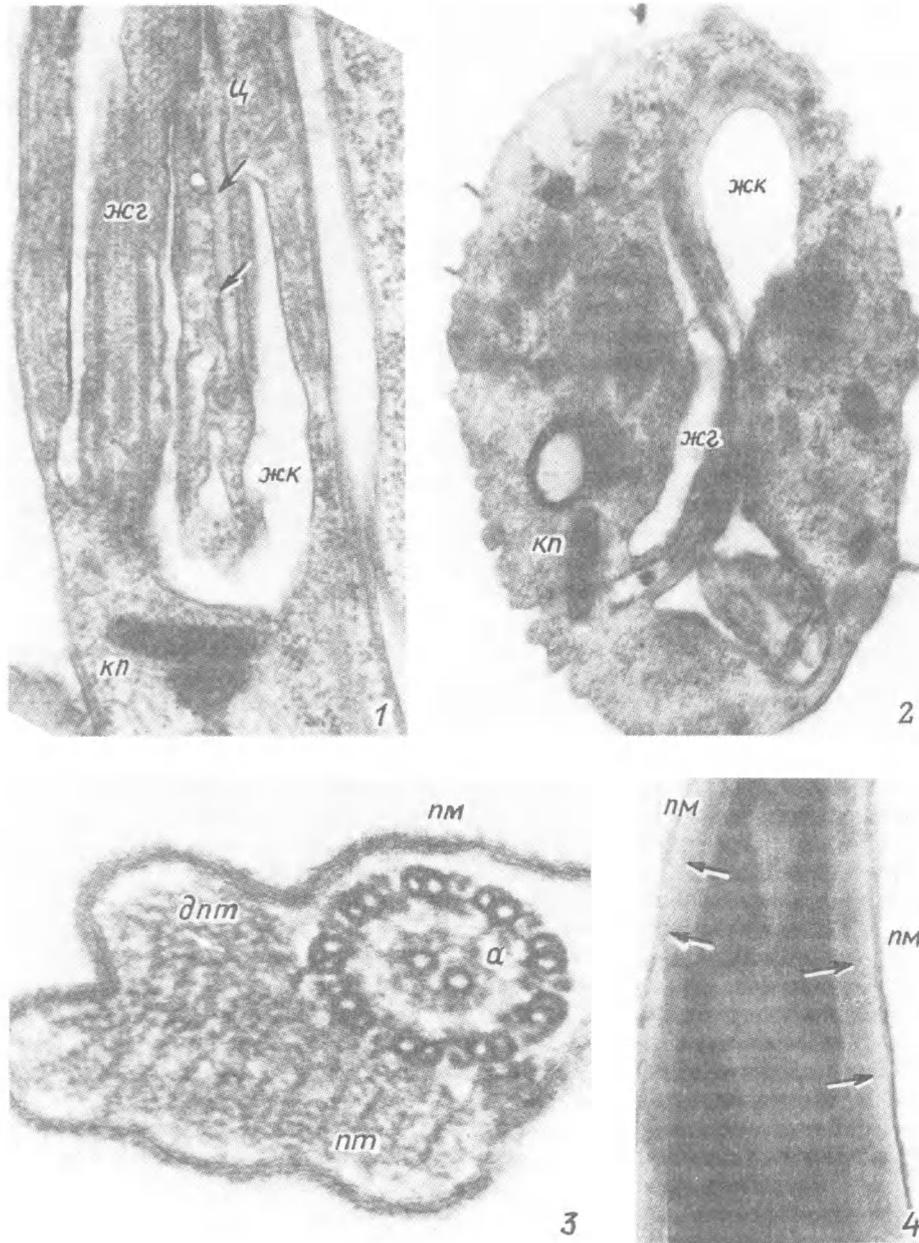


Рис. 3. Ультраструктура некоторых трипаносоматид.

1 — цитостом — цитофарингеальный комплекс *Leptomonas* sp. Nfm.; ЖГ — жгутик; ЖК — жгутиковый карман; КП — кинетопласт; Ц — цитостом; стрелки показывают цитофарингеальный канал, увел. $\times 25\,000$; 2 — ультраструктура эндомитохондрии *Leptomonas peterhoffi*, увел. $\times 15\,000$; 3 — поперечный срез жгутика *Phytomonas serpens*; А — аксонема; ДПТ — дополнительный фрагмент параксиального тяжа; ПМ — плазмалемма; ПТ — параксиальный тяж, увел. $\times 80\,000$; 4 — ультраструктура цистоподобной амастиготы *Leptomonas jaculum*; ПМ — плазмалемма, стрелки показывают слой специализированной субмембранной цитоплазмы, увел. $\times 60\,000$.

Fig. 3. Ultrastructure of some trypanosomatids.

недостатком методов нумерического (фенетического) анализа — использованием невзвешенных признаков. *Leptomonas* sp. Nfm столь сильно отличается от остальных трипаносоматид из насекомых отмеченными выше признаками, что выпадает из этой группы и формально примыкает к лейшманиальной ветви по другим, с нашей точки зрения, второстепенным признакам (промастиготность, развитие в кишке насекомого в передней позиции). Этот пример еще раз подчеркивает общеизвестные, но часто забываемые принципы, утверждающие, что, с одной стороны, результаты применения любого метода не должны восприниматься как абсолютная истина и, с другой — что данные, полученные только одним методом, не являются достоверными и должны быть проверены на соответствие всей совокупности имеющихся данных.

Необычность отдельных черт строения *Leptomonas* sp. Nfm в принципе могла бы исказить и позицию этого изолята на УП-ПЦР дендрограмме. Для быстро эволюционирующих линий (организмов) известен так называемый «артефакт длинных ветвей», выражающийся в том, что быстро дивергирующие даже по единичным молекулярным маркерам организмы занимают положение на конце длинных ветвей, которые по формальным причинам располагаются в основании построенной дендрограммы, причем чем ветвь длиннее, тем более исходное положение занимает организм (Felsenstein, 1978; Olsen, 1987; Philippe, Adouette, 1998). Этот эффект особенно заметен при выраженной неравномерной (хаотичной) скорости изменений разных генов, делающей неприменимой концепцию молекулярных часов, как это и имеет место у кинетопластид (Philippe, 1998). Опасность артефакта длинных ветвей особенно велика при построении филогений по результатам определения последовательностей одного гена. По понятным причинам эта опасность уменьшается с увеличением количества исследованных молекулярных маркеров и становится минимальной при тотальной оценке генома. Поскольку все варианты ПЦР со случайными праймерами, в том числе и УП-ПЦР, являются методами тотальной оценки генома (Tibaugenc, 1966; Tibaugenc e. a., 1993), при их использовании вероятность таких артефактов представляется минимальной. Как уже упоминалось, *Leptomonas* sp. Nfm занимает отдельную позицию среди трипаносоматид насекомых и на ПЦР со случайными праймерами. Таким образом, в случае с *Leptomonas* sp. Nfm мы склонны признать правильными результаты качественной оценки морфологических признаков и УП-ПЦР дендрограммы, а не компьютерной нумерической филогении по немолекулярным признакам.

Прекрасный пример совпадения всей совокупности сведений по биологии, морфологических и молекулярных данных дает несомненно монофилетический на обеих дендрограммах кластер, включающий представителей рода *Wallaceina* (рис. 1, 2). Этот род, последний по времени описания (как *Proteomonas* Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990) род трипаносоматид, был выделен на основании наличия оригинальных стадий жизненного цикла — эндомастигот с необычным жгутиковым карманом (Подлипаев и др., 1990). Эндомастиготы играют роль инвазионных цистоподобных стадий (Фролов, Малышева, 1992), однако не имеют специализированных структур, присущих цистам представителей родов *Leptomonas* и *Blastocrithidia* (Фролов, Подлипаев, 1996).

Виды *Wallaceina* имеют ряд черт, сближающих этот род с *Herpetomonas* и *Crithidia*: сходное строение цитостома, развитие в ректуме насекомого, как у критидий, и длинный жгутиковый карман, как у херпетомонасов, однако отличаются от представителей этих родов петлеобразным жгутиковым карманом у эндомастигот *Wallaceina* (рис. 3, 2). На немолекулярной дендрограмме *W. inconstans* и *W. brevicula* вместе с *Leptomonas peterhoffi* образуют монофилетический кластер (рис. 1). На УП-ПЦР дендрограмме эта же ветвь с добавлением еще одного вида (*Blastocrithidia gerricola*) также представляется высоко достоверной (рис. 2). Перекрестная гибридизация продуктов ПЦР объединяет все перечисленные выше 4 вида в одну естественную группу и свидетельствует о высокой степени гомологии сравниваемых последовательностей ДНК у этих изолятов (Podlipaev, Bulat, 1998; Bulat e. a., 1999).

Филогения, построенная по данным ПЦР со случайными праймерами, в том числе и наличие синапоморфных паттернов (Подлипаев, Баньюльс, Долле, неопубликован-

ные данные), также подтверждают наличие и самостоятельность этой ветви эволюции трипаносоматид. Кроме того, собственно виды рода *Wallaceina* (*W. inconstans* и *W. brevicula*) характеризуются и размером миниколец кинетопластной ДНК (Kolesnikov e. a., 1990), и максимальным среди трипаносоматид содержанием Г—Ц оснований (Юрченко, 1999). Таким образом, род *Wallaceina* является в настоящее время единственным родом гомоксенных трипаносоматид, в реальном существовании и валидности которого сомнений не возникает.

Другой вид из кластера *Wallaceina* — *Leptomonas peterhoffi* был описан как *Leptomonas* на основании присутствия промастигот в кишечнике хозяина (Подлипаев, 1985). Дальнейшее исследование этого паразита (Малышева, Скарлато, 1989) показало наличие клеток с основным признаком рода *Wallaceina* — изогнутым жгутиковым карманом (рис. 4), что подтверждает данные дендрограмм и перекрестной гибридизации ДНК о близости этого организма к *Wallaceina*.

Blastocrithidia gerricola была описана как *Blastocrithidia* на основании наличия эпимастигот в хозяине, и одновременно было высказано предположение, основанное на строении клеток в лабораторной культуре, что при выделении изолята имела место смешанная инвазия и иной организм (не *Blastocrithidia*) мог быть изолирован в лабораторную культуру (Подлипаев, 1985). Исключительно широкая специфичность трипаносоматид насекомых (Подлипаев и др., 1998; Bulat e. a., 1999) и их способность переживать в случайном хозяине длительное время (Hurregich e. a., 1992) повышают вероятность находок и выделения в культуру смешанной инвазии или неспецифического паразита. В случае хищных насекомых эта вероятность повышается, так как они могут аккумулировать паразитов, полученных от жертв. Возможно, что именно такой случай имел место, когда культура *B. gerricola* была выделена из хищного клопа *Gerris lacustris* (Подлипаев, 1985). Теперь ясно, что морфологический анализ естественной зараженности насекомого не достаточен для суждения об отсутствии смешанной инвазии в насекомом и о том, какой паразит был выделен в культуру, особенно если подозревалась смешанная инвазия.

Поскольку группа, включающая субкластер из видов *Wallaceina* и два других изолята, бесспорно представляется естественной по всей совокупности имеющихся данных, и поскольку не все признаки *Leptomonas peterhoffi* и *Blastocrithidia gerricola* соответствуют характеристикам *Wallaceina*, мы предлагаем расширить границы этого рода и основать два подрода в пределах рода *Wallaceina*.

Подрод *Wallaceina* Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990.

Типовой вид: *Wallaceina inconstans* (Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990).

Описание: соответствует описанию рода, присутствуют четко выраженные эндомастиготы.

Состав: *Wallaceina brevicula* (Frolov et Malysheva, 1989), *Herpetomonas maria-deanei* (Yoshida, Freymuller et Wallace, 1978). Последний вид был перенесен в *Wallaceina* из рода *Herpetomonas* на основании наличия эндомастигот.

Подрод *Leptowallaceina* subgen. n.

Типовой вид *Leptomonas peterhoffi* (Podlipaev, 1985).

Описание: вместо типичных эндомастигот присутствуют округлые клетки с переменным положением кинетопласта.

Состав: *Blastocrithidia gerricola* (Podlipaev, 1985).

Следующая группа, представляющая интерес в контексте обсуждаемой проблемы, — трипаносоматиды растений, условно объединяемые в род *Phytomonas*. К настоящему времени описано около 30 видов и находок этих паразитов (Подлипаев, 1990), привлекающих большое внимание как возбудители опаснейших заболеваний некоторых культурных растений (Dollet, 1984). Исходя из филогений, построенных по генам рРНК, *Phytomonas* представляется монофилетичным родом (Hollar, Maslov, 1997), а по данным ПЦР и гибридизации ДНК, — или чрезвычайно полиморфным, или полифилетичным (Muller e. a., 1997; Podlipaev, Bulat, 1998; Bulat e. a., 1999). И на немоллекулярной, и на УП-ПЦР дендрограммах исследованные представители *Phytomonas* образуют самостоятельный кластер (рис. 1, 2), однако не демонстрируют

гомологии ДНК по данным гибридизационных экспериментов (Podlipaev, Bulat, 1998; Bulat e. a., 1999).

Качественная оценка морфологических признаков достаточно определенно свидетельствует в пользу единства растительных трипаносоматид. *Phytomonas* характеризуются необычным параксиальным тяжем, состоящим из двух элементов (рис. 3, 3), и полным отсутствием цитостом-цитофарингеального комплекса (Frolov, Karpov, 1995), что отмечено только у *Trypanosoma brucei* и цистообразующих низших трипаносоматид (Фролов, 1993, Frolov, Karpov, 1995). К числу этих характеристик следует добавить развитие *Phytomonas* в слюнных железах клопов, не свойственное гомоксенным трипаносоматидам насекомых, а также сам факт паразитирования в растениях.

Чрезвычайно интересным представляется объединение на немолекулярной дендрограмме типичного паразита млечного сока молочаев *Phytomonas* sp. EM1 с *Ph. nordicus* — единственным представителем этого рода, не связанным в своем развитии с растениями (Фролов, Малышева, 1993). Будучи описанным из хищного клопа, по своим морфологическим характеристикам этот паразит близок к трипаносоматидам растений (Фролов, Малышева, 1993), что находит подтверждение и на дендрограмме (рис. 1). Этот факт подкрепляет оригинальные предположения о жизненном цикле *Ph. nordicus*, сделанные при его описании (Фролов, Малышева, 1993), и делает вероятным наличие неожиданных путей освоения новых хозяев трипаносоматидами. Нам представляется, что для обоснованных суждений о филогении трипаносоматид — паразитов растений необходимо исследование большого числа их новых изолятов.

Терминальную часть кроны на немолекулярной дендрограмме (рис. 1) образует кластер *Leishmania—Endotrypanum*. Объединение эндотрипанума и лейшманий в одну группу подтверждается практически всеми имеющимися молекулярными филогениями (Marche e. a., 1995; Maslov e. a., 1996; Philippe, 1998, и др.).

Ситуация с таксономическим статусом *Endotrypanum* представляется достаточно парадоксальной. Род *Endotrypanum* Mesnil et Brimont, 1908 включает два вида — *E. monterogei* Schaw, 1969 и *E. schaudinni* Mesnil et Brimont, 1908 — эритроцитарных паразитов ленивцев *Choloepus didactylus* в Центральной и Южной Америке. Первый вид имеет внутриэритроцитарные эпимастиготы, второй — трипомастиготы. По набору клеточных морфотипов *E. schaudinni* соответствует паразитам насекомых из рода *Blastocrithidia*. *E. monterogei* имеет трипомастиготы — определяющий признак жгутиконосцев позвоночных из рода *Trypanosoma*. Учитывая то, что и эпи- и трипомастиготы присутствуют у позвоночных хозяев в жизненных циклах трипаносом из группы Stercoraria, в частности у южноамериканской *Trypanosoma cruzi* (Molyneux, Ashford, 1983), и то, что оба вида *Endotrypanum* были описаны с большим перерывом из одного хозяина и в одном регионе, можно предположить, что описанные виды представляют собой просто разные стадии развития одного паразита. Единственным характерным признаком рода *Endotrypanum*, таким образом, остается внутриэритроцитарная локализация паразитов, однако мы сомневаемся как в исключительности этого паразита, так и в его таксономическом ранге.

Как паразиты позвоночных (напомним, что таксономическое положение хозяина является одним из классических систематических критериев у трипаносоматид), имеющие эпи- или трипомастиготы и не отличающиеся по набору клеточных морфотипов (Molyneux, Ashford, 1983) от собственно трипаносом, эти жгутиконосцы в действующей системе трипаносоматид должны быть помещены в род *Trypanosoma*. Таким образом, основываясь на классических таксономических критериях, нет никаких оснований для выделения трипаносоматид ленивцев в отдельный род.

Молекулярные данные, однако, не позволяют переместить этих паразитов в род *Trypanosoma*. Структура генов рРНК однозначно свидетельствует о принадлежности *Endotrypanum* к *Leishmania*, вероятно к подроду *Sauroleishmania* (Marche e. a., 1995; Maslov e. a., 1996; Philippe, 1998). Дополнительным свидетельством в пользу этого предположения служит то, что переносчиками *Endotrypanum* служат москиты из рода *Lutzomyia*, которые никогда не переносят трипаносом, но являются обычными

переносчиками южноамериканских лейшманий (Molyneux, Ashford, 1983; Подлипаев, 1990). В ленивцах *Choloepus* были найдены и *Leishmania*, и *Trypanosoma* (Подлипаев, 1990). Таким образом, представляется весьма вероятным, что трипаносоматиды ленивцев на самом деле принадлежат к роду *Leishmania*.

Достаточно неожиданным оказалось объединение в единую ветвь моноксенных трипаносоматид, имеющих в жизненных циклах инвазионные цистоподобные стадии (рис. 1). Пока эти изоляты не исследованы молекулярными методами, поэтому здесь мы обсуждаем только морфологические данные. На немоллекулярной дендрограмме высокодостоверный кластер образован представителями двух родов — *Blastocrithidia gerridis*, *B. miridarum* и *Leptomonas jaculum* (рис. 1). Эти изоляты имеют важные общие морфологические и биологические признаки: отсутствие следов оформленного ротового аппарата (Frolov, Kargin, 1995); развитие в средней кишке и формирование цист в ректуме хозяев (Фролов, Скарлато, 1995); все они (вероятно, в силу отсутствия ротовых аппаратов) отличаются повышенными требованиями к питательной среде и плохо культивируются (Wallace, 1966). Единственные отличия между ними — разные дискриминирующие клеточные морфотипы клеток в хозяине: эпимастиготы — у *Blastocrithidia* и промастиготы — у *Leptomonas*. Однако дискретность, надежность и таксономическое значение этих признаков подвергаются все большим сомнениям (Wallace e. a., 1983; Подлипаев и др., 1998, и др.). Полученные нами данные говорят о том же.

Особенно интересно присутствие в этой группе *Leptomonas jaculum* потому, что по своей ярко выраженной промастиготной морфологии этот вид является несомненным лептомонасом и мог бы претендовать на место типового вида этого рода (Wallace, 1979), после того как выяснилась принадлежность к эвгленовым прежнего типового вида *L. bütschli*. По нашим данным, *L. jaculum*, очевидно, вовсе не относится к роду *Leptomonas*.

Цисты видов, объединяющихся в обсуждаемый кластер, имеют уникальное строение, не имеющее аналогов у других трипаносоматид (Фролов, Подлипаев, 1996; Фролов и др., 1997а): защитный специализированный слой формируется под плазмалеммой, с внешней средой контактирует непосредственно цитоплазма (рис. 3, 4). Такое строение цист отмечено только у свободноживущих криптобиид из рода *Dimastigella* (Фролов и др., 1997б). Здесь важно вспомнить, что в настоящее время криптобии рассматриваются как непосредственные предки паразитических трипаносоматид, давшие начало гетероксенным *Trypanosoma* (Фролов, 1993). Между тем среди всех крупных ветвей кинетопластид только современные *Trypanosoma* характеризуются отсутствием каких-либо цистоподобных инвазионных стадий, что позволяет предположить их вторичную потерю этими паразитами, связанную с развитием механизма передачи инвазии с помощью переносчика. Цистоподобные стадии современных моноксенных трипаносоматид насекомых могли быть получены ими от общих с трипаносомами предков или от каких-то несохранившихся до настоящего времени древних трипаносом. Не исключено, что исследование очень слабо изученных паразитов амфибий и рептилий может принести неожиданные находки цистообразующих трипаносом.

Цистообразующие трипаносоматиды *Blastocrithidia gerridis*, *B. miridarum* и *Leptomonas jaculum*, образующие достоверный кластер на дендрограмме и имеющие четкие отличительные признаки, могут, таким образом, претендовать на самостоятельный таксономический статус в ранге рода. Дальнейшие исследования, в том числе и с использованием молекулярных маркеров, необходимы для подтверждения этого предположения и произведения соответствующей таксономической акции.

Наши данные говорят об искусственности родов *Leptomonas*, *Crithidia* и *Herpetomonas*, представители которых находятся в разных частях дендрограмм, что еще раз подтверждает мнение о неадекватности имеющихся таксонов для описания разнообразия трипаносоматид. В настоящее время, когда молекулярные филогении являются чуть ли не основным методом реконструкции эволюции для самых разных групп организмов, необходимы поиски соответствий конкретных филогений, построенных

как молекулярными методами, так и с использованием морфологических признаков для преодоления наметившейся несравнимости и несводимости современных данных со всем массивом информации, накопленной классическими методами.

Проведенное в настоящей работе сравнение дендрограммы, построенной по морфологическим и биологическим данным, с дендрограммой, построенной по молекулярному маркеру, выявило изоморфность основных кластеров, что говорит об адекватности обоих методов для филогенетических реконструкций. Имеющиеся расхождения требуют дальнейшего исследования с привлечением большего материала.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты: 99-04-49489 (Ф.А.О.) и 99-04-49572 (П.С.А.).

Список литературы

- Карпов С. А. Система протистов. Омск, 1990. 261 с.
- Крылов М. В., Добровольский А. А., Исси И. В., Михалевич В. И., Подлипаев С. А., Решетняк В. В., Серавин Л. Н., Старобогатов Я. И., Шульман С. С., Янковский А. В. Новые представления о системе одноклеточных животных // Тр. ЗИН АН СССР. 1980. Т. 94. С. 122—132.
- Малышева М. Н., Скарлато С. О. Исследование ультратонкой организации жгутиконосцев *Leptomonas peterhoffi*, культивируемых на жидкой и твердой питательных средах // Цитология. 1989. Т. 31, № 3. С. 267—272.
- Марахова Н. В., Скарлато С. О., Фролов А. О., Цуладзе А. М. Полиморфизм молекулярных кариотипов низших трипаносоматид // Цитология. 1991. Т. 33, № 10. С. 59—64.
- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипаносоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии из жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Тр. ЗИН АН СССР. 1985. Т. 129. С. 35—47.
- Подлипаев С. А. Каталог мировой фауны простейших семейств Trypanosomatidae (Protozoa) // Тр. ЗИН АН СССР. 1990. Т. 217. 177 с.
- Подлипаев С. А., Рокицкая Т. А. Классификация изолятов трипаносоматид насекомых: использование анализа изоферментов // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 4. С. 350—357.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545—552.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 4. С. 339—345.
- Подлипаев С. А., Мокроусов И. В., Булат С. А. К молекулярной геносистематике трипаносоматид из насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР) // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 4. С. 317—326.
- Серавин Л. Н. Простейшие — что это такое? Л.: Наука, 1984. 174 с.
- Скарлато С. О., Сомова Н. В., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Бобылева Н. Н., Фролов А. О. Особенности организации хромосомного аппарата жгутиконосцев *Crithidia* sp. // Цитология. 1998. Т. 40. С. 991—1005.
- Старобогатов Я. И. К вопросу о числе царств эукариотных организмов // Тр. ЗИН АН СССР. 1986. т. 144. с. 4—25.
- Фролов А. О. Происхождение трипаносоматид // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 2. С. 97—107.
- Фролов А. О. Классификация морфологических форм жгутиконосцев семейства Trypanosomatidae // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 4. С. 261—269.
- Фролов А. О. Новая гипотеза происхождения трипаносоматид: Автореф. дис... докт. биол. наук. СПб., 1997. 49 с.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. *Crithidia allae* sp. n. и *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) из клопа *Nabis brevis* // Зоол. журн. 1989. Т. 68, вып. 7. С. 5—10.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Эндамастиготы — особый тип расселительных стадий трипаносоматид рода *Proteomonas* // Паразитология. 1992. Т. 26, вып. 4. С. 351—354.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Описание *Phytomonas nordicus* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) из хищного клопа *Troilus luridus* (Hemiptera, Pentatomidae) // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 3. С. 227—232.

- Фролов А. О., Подлипаев С. А. Необычный способ формирования инвазионных стадий у *Leptomonas rigidus* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) // *Паразитология*. 1966. Т. 30, вып. 6. С. 473—477.
- Фролов А. О., Малышева М. Н., Подлипаев С. А. Необычный способ формирования цистоподобных стадий у бластокритидий (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), паразитирующих в кишечном тракте клопов водомерок (Hemiptera, Gerridae) // *Паразитология*. 1997а, Т. 31, вып. 5. С. 356—363.
- Фролов А. О., Мыльников А. П., Малышева М. Н. Электронно-микроскопическое исследование нового вида свободноживущего жгутиконосца *Dimastigella mimosa* sp. n. // *Цитология*. 1997б. Т. 39, вып. 6. С. 442—448.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. Тонкое строение и механизмы адаптации низших трипаносоматид в полужесткокрылых насекомых // *Цитология*. 1995. Т. 37, вып. 5. С. 539—560.
- Юрченко В. Ю. Множественность форм организации миникольцевого компонента кинетопластной ДНК Trypanosomatidae: Автореф. дис... канд. биол. наук. М., 1999. 21 с.
- Baker J. The evolutionary origin and speciation of the genus *Trypanosoma* // *Society of General Microbiology Symposium*. 1974. Vol. 25. P. 343—366.
- Bulat S. A., Mokrousov I. V., Podlipaev S. A. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed OCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products // *Europ. J. Protozool.* 1999. Vol. 35. P. 319—326.
- Cavalier Smith T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla // *Microbiological Reviews*. 1993. Vol. 57. P. 953—994.
- Corliss J. The kingdom Protista and its 45 phyla // *Bio-Systems*. 1984. Vol. 17. P. 87—126.
- Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*) // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1984. Vol. 22. P. 115—132.
- Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading // *Systematic Zoology*. 1978. Vol. 27. P. 401—410.
- Felsenstein J. PHYLIP Manual Version 3.5. University Herbarium, 1993, University of California, Berkeley, California.
- Frolov A. O., Karpov S. A. Comparative morphology of kinetoplastids // *Cytology*. 1995. Vol. 37. P. 1072—1096.
- Hoare C. A., Wallace F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology // *Nature*. 1966. Vol. 212. P. 1385—1386.
- Hollar L., Maslov D. A. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997. Vol. 89. P. 295—299.
- Hollar L., Lukes J., Maslov D. A. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy // *J. Euk. Microbiol.* 1998. Vol. 45, N 3. P. 293—297.
- Hupperich K., Camargo E. P., Milder R. Ultrastructural study of the host-parasite relationship of trypanosomatids in the housefly // *Parasitol. Res.* 1992. Vol. 78. P. 48—55.
- Kolesnikov A. A., Maslov D. A., Podlipaev S. A. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR // *Arch. Protistenk.* 1990. Bd 138. S. 239—250.
- Leger L. Sur la morphologie du *Trypanoplasma* du varions // *C. R. Hebd. Seances de l'Academie des Sciences, Paris* 1904. Vol. 138. P. 824—825.
- Levine N. D. Nomenclature of *Leptomonas pessoai* // *J. Parasitology*. 1978. Vol. 64. P. 668.
- Marche S., Roth C., Philippe H., Dollet M., Baltz L. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. Vol. 71. P. 15—26.
- Maslov D. A., Lukez J., Jirku M., Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996. Vol. 75. P. 197—205.
- Molyneux D. H., Ashford R. W. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor and Francis, London, 1983. 294 p.
- Muller E., Gargani D., Banuls A. L., Tibayrenc M., Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis // *Parasitology*. 1997. Vol. 115. P. 403—409.
- Olsen G. J. Earliest phylogenetic branchings: comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques // *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 1987. Vol. 52. P. 825—837.
- Philippe H. Molecular phylogeny of kinetoplastids // *Evolutionary relationships among Protozoa*. G. H. Coombs, K. Vickerman, M. A. Sleigh, A. Warren (eds.). 1998. P. 195—212.

- Philippe H., Adouette A. The molecular phylogeny of Eukaryota: solid facts and uncertainties // Evolutionary relationships among Protozoa. G. H. Coombs, K. Vickerman, M. A. Sleight and A. Warren, Eds. 1998. P. 25—26.
- Podlipaev S. A., Bulat S. A. Characterisation of trypanosomatids from insects and plants: UP-PCR (universally primed PCR) and cross hybridization of PCR products. Zoological Sessions. Proc. Zoological Inst. RAS. 1998. Vol. 276. P. 155—160.
- Podlipaev S. A., Malysheva M. N., Kolesnikov A. A. *Leptomonas rigidus* sp. n. (Trypanosomatidae) — a parasite of *Salda littoralis* L. Hemiptera: Heteroptera) // Acta Protozoologica. 1991. Vol. 30. P. 121—127.
- Tibayrenc M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms // Annu. Rev. Microbiol. 1996. Vol. 50. P. 401—429.
- Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini P., Skarezky D., Ayala F. G. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993. Vol. 90. P. 1335—1339.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates // Intern. J. Parasitol. 1994. Vol. 24, N 8. P. 1317—1331.
- Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of Insects and Arachnids // Exp. Parasitol. 1966. Vol. 18. P. 124—193.
- Wallace F. G. Biology of the Kinetoplastida of arthropods // Biology of the Kinetoplastida. Vol. 2. London, 1979. P. 213—240.
- Wallace F. G., Camargo E. P., McGhee R. B., Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids // J. Protozoology. 1983. Vol. 30. P. 308—313.
- ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034 Поступила 15.11.1999

PHYLOGENY OF TRYPANOSOMATIDS: MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL RESEARCHES

S. A. Podlipaev, A. O. Frolov

Key words: Trypanosomatids, ultrastructure characters, morphology, PCR polymorphism, phylogeny, taxonomy.

SUMMARY

The results of comparative analysis of two phylogenetic trees of the trypanosomatids based on morphological and molecular characters are discussed. The morphological dendrogram was based on 33 ultrastructural characters, 6 light microscope characteristics and 8 biological characters. Molecular UPGMA dendrogram depicting differences (Dice distance) between examined trypanosomatids is based on the universally primed PCR polymorphisms. The general topology of both dendrograms are similar, with the *Trypanosoma* at the base. The genus *Wallaceina* appears to be monophyletic. In a contrary, the genera *Leptomonas*, *Crithidia* and *Herpetomonas* look like artificial groups according to both methods used. The cyst-forming homoxenous trypanosomatids from insects represent a monophyletic clade, which seems to be a separate genus. Two species of within genus *Wallaceina* are arranged as a separate subgenus.
