

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова  
Биологический факультет

---

На правах рукописи  
УДК 577.212.3:57.086

**Николаев Сергей Игоревич**

**Родственные отношения различных групп  
солнечников с другими группами простейших на  
основе маркёров 18S рДНК и актинового гена.**

03.00.03. – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2003 г.

Работа выполнена в отделе эволюционной биохимии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Научный руководитель:

доктор биологических наук  
Петров Н.Б.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
Подлипаев С.А.

кандидат биологических наук  
Асеев В.В.

Ведущая организация:

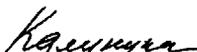
Институт общей генетики им.  
Н.И. Вавилова РАН.

Защита диссертации состоится 10 декабря 2003 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан 6 ноября 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Калинина Н.О.

2003-A  
18356

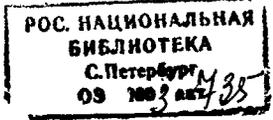
## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Молекулярно-филогенетические исследования выявили колоссальное разнообразие одноклеточных эукариот, которые формируют на эукариотическом эволюционном древе как минимум восемь основных групп (Baldauf, 2003). Это разнообразие может оказаться еще более широким в свете недавних исследований природных субстратов, выявивших путём анализа ДНК ряд эукариотических таксонов высокого ранга (Dawson, Pace, 2002; Edgcomb et al., 2002; Massana et al., 2002; Moreira, Lopes-Garcia, 2002) Точная оценка такого разнообразия затруднена тем, что до сих пор существует ряд групп легко определяемых и культивируемых простейших, для которых нет или недостаточно данных о последовательностях ДНК (Baldauf, 2003) Бедно представлены в молекулярных базах данных амёбоидные эукариоты (Bolívar et al., 2001; Peglar et al., 2003).

Использование последовательности гена 18S рРНК как универсального филогенетического маркера позволило установить родственные отношения между одноклеточными эукариотами на разном таксономическом уровне, однако в силу особенностей эволюции этого гена филогенетическое положение ряда таксонов остаётся невыясненным. В таких случаях требуется привлечение дополнительных групп данных, например, анализа последовательности других генов или изучения вторичной структуры гена 18S рРНК (Billoud et al., 2000; Rokas, Holland, 2000; Петров, Алёшин, 2002). Эти методы, применяемые параллельно, приводят к более чётким и достоверным результатам и позволяют постепенно переходить от изучения эволюции конкретного гена к эволюции генотипов.

В настоящее время данные о филогенетическом положении многочисленных таксонов солнечников в системе протистов остаются весьма противоречивыми. Исторически солнечники (*Heliozoa* Naeskel, 1866) были определены как свободноживущие амёбоидные простейшие, объединяемые наличием мощной радиальной системы из расходящихся от всего тела лучей, снабжённых стрекательными органеллами для закрепления и доставки добычи. Солнечники – это пассивные хищники, питающиеся, в основном, мелкой подвижной добычей и являющиеся консументами высшего порядка в морских и пресноводных микробентосных сообществах. Даже в самых последних системах эукариот солнечники по-прежнему занимают высокий ранг типа *Heliozoa*, хотя на основании различий ультраструктурной организации было высказано предположение, что они являются сборной группой, включающей представителей эволюционно далёких таксонов, которые приобрели сходный внешний облик из-за сходства условий обитания (Шульман, Решетняк, 1980, 1981;



Febvre-Chevalier, 1982; Smith, Patterson, 1986; Микрюков, 1998 а; Mikjukov et al., 2000; Patterson, 1994). Для решения этого вопроса целесообразно было бы применить методы геносистематики (Антонов, 1974).

К настоящему времени имеется очень мало молекулярных данных для определения положения солнечников на древе жизни. Так, у представителя *Centroheliozoa* описано слияние генов дегидрофолат редуктазы и тимидилат синтазы, что является сильным аргументом в пользу представлений о положении этой группы внутри *Vikonta* (Stechmann, Cavalier-Smith, 2002), и, как следствие, указывает на наличие у них двужгутикового предка. В связи этим можно вспомнить об описании Шаудинном двужгутиковой зооспоры для центрохелидного солнечника (Shaudinn, 1896). Сравнение последовательностей генов 18S рРНК и *rbcL* указывает на положение цилиофридных солнечников *Ciliophrys* и *Pteridomonas* в составе разных групп пединеллидных хелиофлагеллат, относящихся к группе *Stramenopiles*, что говорит в пользу полифилетичности таксона *Ciliophryida* (Sekiguchi et al., 2002). Исследование гена 18S рРНК представителей рода *Nuclearia* (сем. *Nucleariidae*) выявило родственные связи этих простейших с группой *Opisthokonta* (Amaral Zettler et al., 2001).

Несмотря на ультраструктурные и цитологические свидетельства полифилии солнечников, этот таксон всё ещё сохраняется в некоторых современных системах (Lecointre, Le Guider, 2001), что говорит об отсутствии надёжного маркёра, способного прояснить структуру родственных отношении этой группы, а также о недостатке молекулярных данных. В случае солнечников молекулярные данные могут стать тем надёжным критерием, с помощью которого можно было бы построить их естественную систему.

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы является определение места солнечников в общей системе протистов и разработка естественной системы солнечников и родственных им групп организмов с применением ряда молекулярно-филогенетических маркёров и методов геносистематики.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить последовательности генов 18S рРНК и актина у ряда ключевых видов солнечников, а также их предполагаемых родственников среди групп *Cergozoa* и *Discocristata*.

2. Оценить возможность применения последовательностей генов 18S рРНК и актина для исследования взаимоотношений таксонов солнечников между собой и с другими родственными организмами.
3. Реконструировать филогенетическую историю различных групп солнечников и связанных с ними таксонов с помощью как традиционных методов филогенетического анализа, так и с помощью поиска синапоморфий во вторичной структуре 18S рРНК.
4. Сопоставить полученные результаты с данными морфологических и молекулярных исследований, оценить их и предложить естественную классификацию солнечников, построенную с учётом достижений молекулярной филогенетики, кладистики и геносистематики.

### Научная новизна и практическая ценность работы

Были определены последовательности генов 18S рРНК и/или актина у десяти видов солнечникообразных организмов (центрохелиды *Chlamydaster sterna*, *Heterophrys marina*, *Pterocystis ernaceoides*, и *Raphidiophrys ambigua*, десмоторацид *Clathrulina elegans* и *Hedriocystis reticulata*, актинофрииды – *Actinosphaerium eichhornii*, *Actinosphaerium nucleofilum*, *Actinophrys sol* и простейшего – *Multicilia marina* неясного таксономического положения), а также у одиннадцати представителей таксонов, чьё родство различным группам солнечников предполагалось на основании ультраструктурных признаков (гимнофрииды – *Gymnophrys cometa*, церкомонады – *Lecithium* sp., *Allas* sp., дискокростаты – *Stephanopogon colpoda*, *Stephanopogon apogon*, *Percolomonas cosmopolitus*, *Klosteria bodomorphis*, *Bodo sorokini*, аталамиды – *Gymnophrydium* sp., апузомонады – *Amastigomonas* sp. и ротосфериды – *Micronuclearia podoventralis*).

Сопоставление полученных последовательностей позволило установить филогенетические связи большинства таксонов солнечников. Построенные кладограммы были сопоставлены с традиционной таксономической системой солнечников, основанной на морфологических признаках. Молекулярными методами показана полифилия солнечников.

Сделаны выводы о границах применимости данных о строении генов 18S рРНК и актина как маркёров для установления родственных отношений в пределах основных таксонов простейших и между ними.

В свете полученных молекулярных данных оценена таксономическая значимость ряда морфологических и ультраструктурных признаков солнечников.

Полученные данные являются вкладом в разработку филогенетической системы эукариот и методологию филогенетического анализа.

### **Апробация работы**

Результаты исследований были представлены на международной конференции "Ломоносов-2003" (Москва, 2003), 4-ом международном конгрессе протистологии и 10-ой европейской конференции по биологии инфузорий (Сан Бенедетто дель Тронто, Италия, 2003).

По результатам работы был сделан доклад на совместном семинаре отдела эволюционной биохимии Института физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского и кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 3 статьи.

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 148 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 3 таблицы и 17 рисунков. Список литературы включает 204 наименований цитированных работ.

### **Содержание работы**

#### **Материалы и методы**

##### **Происхождение образцов и выделение ДНК и РНК**

В данной работе были использованы культуры организмов взятые из коллекций А. П. Мыльникова (ИБВВ РАН) и АТСС. Морские культуры выращивали на среде Шмальца-Пратта, а пресноводные – на среде Пратта. Бактериофаговые организмы питались бактериями *Aerobacter aerogenes*, пресноводные хищники – бодонидой *Bodo saltans*, морские хищники – бодонидой *Bodo sorokinii*. Список изученных видов и происхождение образцов, из которых была выделена ДНК и/или РНК, а также размеры секвенированных фрагментов генов 18S рРНК и актина приведены в таблице 1.

Таблица 1. Данные об анализированных в работе простейших.

Таксон	Видовое название	Ген 18S рРНК			Ген актина		
		Выделение ДНК/РНК	Длина фрагмента	Номера GenBank	Выделение ДНК/РНК	Длина фрагмента	Номера GenBank
Центрохелидные солнечники	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (п, а)	ДНК, РНК	1719	AY268042	ДНК, РНК	789	AY283744
	<i>Heterophrys marina</i> (м; б)	ДНК	2036	AY268041	-	-	
	<i>Pterocystis erinaceoides</i> (п, а)	ДНК	1713	AY268043	ДНК, РНК	789	AY283745
	<i>Rhaphidophrys ambigua</i> (п, с)	ДНК	2123	AY305008	ДНК	967	AY283746
Активнофридные солнечники	<i>Actinophrys sol</i> (п; с)	ДНК, РНК	556 + 196 (част)	XXX	ДНК	784	AY283758 AY283759 AY283760
	<i>Actinosphaerium etchhornii</i> (п, с)	ДНК, РНК	2776	AY305011	ДНК	869	AY283757
	<i>Actinosphaerium nucleofilum</i> (п, с)		-		ДНК	784	AY283761 AY283762
Десмоторацидные солнечники	<i>Clathrulina elegans</i> (п; а)	РНК	2073	AY305009	РНК	784	AY283754
	<i>Hedriocystis reticulata</i> (п; а)	ДНК	2022	AY305010	ДНК	784	AY283755
Ротосферидные солнечники	<i>Micronuclearia podoventrals</i> (п; д)	ДНК, РНК	1709	AY268038	ДНК, РНК	784	AY283747
Гимноспериды	<i>Gymnophrys cometa</i> (п; д)	ДНК	1814	AJ514866	-	-	
Аталамиды	<i>Gymnophrydium</i> sp (м, д)	ДНК	1753	AY268044	-	-	
Pseudociliata	<i>Stephanopogon apogon</i> (м, б)		-		ДНК	784	AY283752 AY283753
	<i>Stephanopogon colpoda</i> (м, б)	РНК	1394 (част)	XXX	ДНК, РНК	784	AY283751
Percolozoa	<i>Percolomonas cosmopolitus</i> (м, б)	ДНК	1809	AF519443	ДНК	784	AY283748
Euglenozoa	<i>Bodo sorokinii</i> (м, б)		-		ДНК	784	AY283749 AY283750
	<i>Klosteria bodomorphus</i> (м; д)	ДНК	2072	AY268046	-	-	
Амобозоа	<i>Multicilia marina</i> (м, с)	ДНК	2746	AY268037	-	-	
Cercozoa	<i>Aillas</i> sp. (м, д)	ДНК	1793	AY268040	-	-	
	<i>Lecythium</i> sp. (м; д)	ДНК	1767	AJ514867	ДНК	768	AY283756
Apusozoa	<i>Amastigomonas</i> sp (м; д)	ДНК	1732	AY268039	ДНК	884	

Част – частичная последовательность

М – морской организм

П – пресноводный организм

При культивировании простейших в качестве жертвы использовались следующие организмы:

a – *Bodo saltans*

b – *Bodo sorokinii*

c – *Tetrahymena* sp.

d – *Aerobacter aerogenes*

e – *Vannella* sp

## **Амплификация ДНК, клонирование и секвенирование**

Для определения последовательности генов из культур клеток проводили выделение ДНК и РНК. Амплификацию участков исследуемых генов проводили, используя концевые и внутренние универсальные эукариотические праймеры, специфические праймеры, комплементарные переменным участкам последовательностей генов исследуемых организмов, или антиспецифические праймеры, некомплементарные участкам последовательностей генов жертвы или присутствующим в культуре минорным организмам. При использовании РНК в качестве матрицы синтезировали кДНК с 3' концевым праймером исследуемого гена, затем проводили реакции амплификации и реамплификации с внутренними универсальными праймерами.

Амплифицированные продукты очищали с помощью набора High Pure PCR Purification Kit (Roche, Rotkreuz, Switzerland), лигировали в pGEM-T Vector System (Promega, Wallisellen, Switzerland) и клонировали в XL-2 ультракомпетентные клетки. От 4 до 20 отобранных колоний секвенировали с помощью набора ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit и анализировали при помощи секвенатора ABI-377 (Perkin- Elmer- Rotkreuz, Switzerland) в соответствии с протоколом производителя.

## **Филогенетический анализ**

Последовательности были выравнены с помощью программы ClustalX, после чего выравнивание корректировали вручную, учитывая модели вторичной структуры (Neefs et al., 1993; Wuys et al., 2000). Последовательности для выравнивания были выбраны из международных баз данных так, чтобы, во-первых, были представлены все основные таксономические группы эукариот и доступных амебодных организмов, и во-вторых, подборка таксонов соответствовала организмам, для которых доступны и последовательности актиновых генов.

В целях определения родственных связей организмов с неизвестным филогенетическим положением сначала анализировали большой набор видов, включающий широкое таксономическое разнообразие эукариот, а затем создавали частное выравнивание, включающее всех доступных представителей отдельной группы.

Филогенетический анализ проводили с использованием разных методов реконструкции филогении: метода объединения ближайших соседей (neighbor-joining, NJ), метода максимальной экономии (maximum parsimony, MP), метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и байесовского метода вычисления постериорных вероятностей (Bayesian inference, BI). Для этого использовали следующие пакеты программ:

Phylip 3.6.a2.1 (Felsenstein, 1993), PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002), PUZZLE 4.0 (Strimmer, von Haesler, 1996) и MrBayes 2.0 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). В качестве статистического критерия при построении филогенетических деревьев использовали показатель бутстрепа (Felsenstein, 1985).

### Анализ вторичных структур рибосомных РНК

Для анализа вторичной структуры рРНК использовали модели, приведённые в Европейской базе данных. Нумерацию шпилек производили в соответствии с моделью Ван де Пира (Van de Peet et al., 2000). Вторичную структуру гена 18S рРНК для некоторых организмов с неясным филогенетическим положением на эукариотическом древе представляли с помощью программы RnaViz 2.0 (De Rijk, De Wachter, 1997).

## Результаты

### Характеристика полученных последовательностей

Были впервые определены последовательности гена 18S рРНК 7 видов солнечнокообразных организмов, а также восьми представителей таксонов, чьё родство различным группам солнечников предполагалось на основании ультраструктурных признаков (Табл 1).

Размер этих последовательностей (исключая области праймеров) варьирует у центрохелид от 1713 п.о. у *P. erinaceoides* до 2036 п.о. у *H. marina* и 2123 п.о. у *R. ambigua* (Табл. 1). Два последних вида имеют вставки в вариабельных областях V2, V4, V5 и V8, а *R. ambigua* – также и в V3 и V7. Длина 18S рРНК у рафидиофрииды *M. podovernalis* составляет 1709 п.о., в то время как у десмоторцид – 2022 п.о. у *H. reticulata* и 2073 у *C. elegans* из-за наличия общих вставок в вариабельных областях V4, V5 и V7. Из изученных нами видов самые длинные гены малой рРНК имеют *A. eichhornii* (2776 п.о.) и *M. marina* (2746 п.о.) из-за вставок в вариабельных областях.

Последовательности значительно различаются по нуклеотидному составу. Г+Ц состав варьирует от 26 % Г+Ц у *A. eichhornii* из-за А+Т - богатых вставок в вариабельных областях до 50.6 % Г+Ц у *H. marina*. Однако эти вариации состава гораздо меньше в консервативных сайтах, выбранных для филогенетического анализа (от 43.4 % Г+Ц у *A. eichhornii* до 49.7 % у *H. marina*).

Последовательности кДНК или генов актинов были получены из центрохелид *C. sterni*, *P. erinaceoides* и *R. ambigua*; десмоторацид *C. elegans* и *H. reticulata*; актинофриид *A. eichhornii*, *A. nucleofitum*, *A. sol*; ротосфериды *M. podovernalis*; дискокростат *S. colpoda*, *S.*

*apogon*, *P. cosmopolitanus*, *B. sorokini*; амастигомонады *Amastigomonas* sp. и церкомонады - *Lecythium* sp. Три различные последовательности гена актина выявлены у *A. sol*, две - у *A. nucleofilum* и по одной у всех остальных видов. Интрон длиной 183 п.о. был обнаружен в гене центрохелиды *R. ambigua* и длиной 99 п.о. у аузомонады *Amastigomonas* sp. Эти вставки не имеют никакой позиционной гомологии ни с одной известной последовательностью актина. В других полученных последовательностях интронов обнаружено не было.

### **Филогенетический анализ**

В работе были проанализированы 13 выравненных, включающих разное количество таксонов и внешних групп. В автореферате приведены результаты обчёта только наиболее информативных наборов.

### **Филогения основных групп солнечников**

На рисунке 1 показано положение трёх основных таксонов солнечников на эукариотическом дереве, реконструированном с помощью программы RadCon из консенсусного дерева байесовского анализа 99 последовательностей 18S рРНК и 66 актиновых последовательностей. Поскольку положение корня эукариотического дерева до сих пор является предметом обсуждения (Stechmann, Cavalier-Smith, 2002), дерево на рисунке 1 представлено в неукоренённой форме с базальной трифуркацией, разделяющей Bikonta, Opisthokonta и Amoebozoa. Топология дерева в основном соответствует предыдущим широкомасштабным филогенетическим реконструкциям эукариот, и все хорошо определяемые таксоны высокого ранга выявлены с надёжной статистической поддержкой при анализе как 18S рРНК, так и актиновых генов. Такое совпадение вселяет надежду на то, что топология дерева при привлечении новых данных существенных изменений не претерпит.

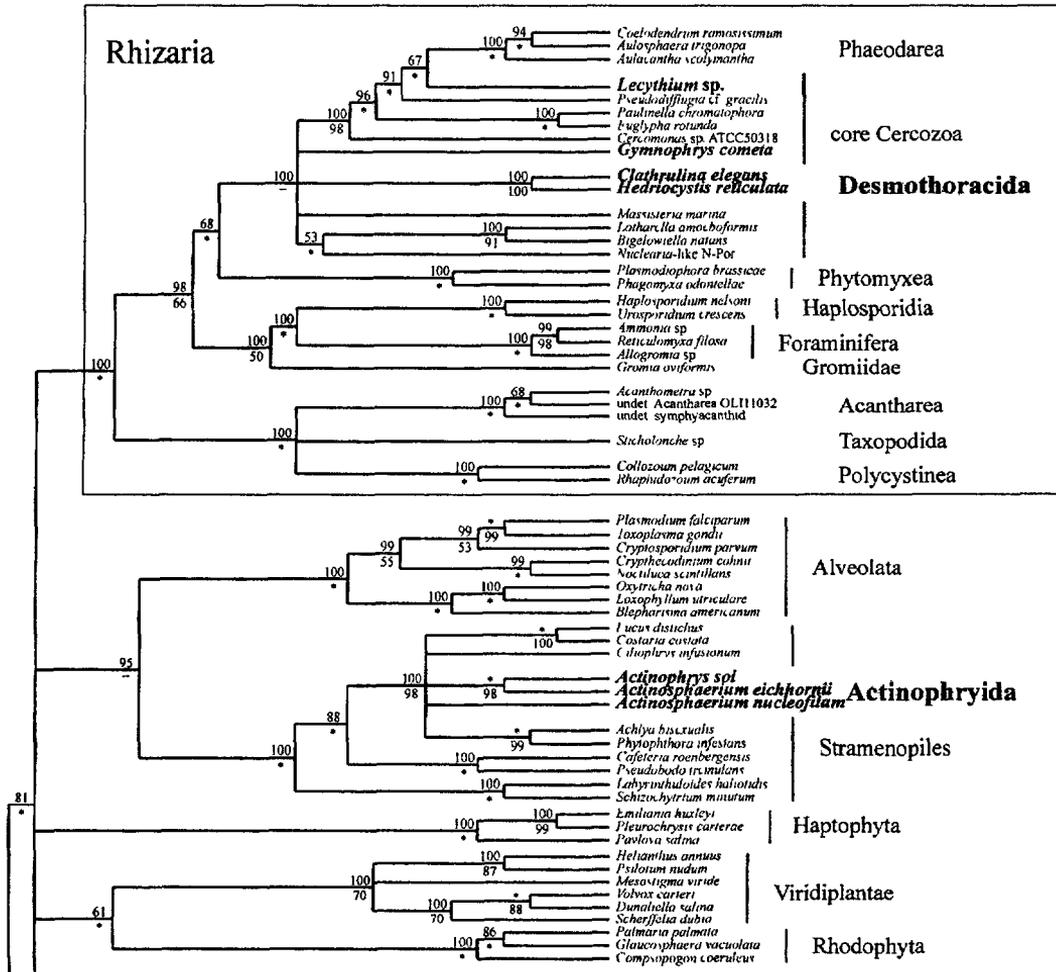
На дереве, показанном на рисунке 1, три основные таксона Heliozoa ответвляются независимо или в составе различных таксонов эукариот, подтверждая полифилетическое происхождение солнечников. Актинофриидные солнечники попадают внутрь группы Stramenopiles (рис.1, 2), десмоторацидные солнечники образуют базальную ветвь внутри ядра Cercozoa, рядом с видами *G. cometa* и *M. marina* (рис.1, 3), центрохелидные солнечники образуют независимую линию эукариот, что согласуется с недавними результатами (Cavalier-Smith, Chao, 2003). Полученные нами четыре новые последовательности гена 18S рРНК центрохелид достоверно группируются с полученными ранее и с последовательностью

неопределённого вида морского солнечника. Вместе они формируют слабо поддерживанную группировку с глаукофитовыми и криптофитовыми водорослями. На активном дереве группы Glaucophyta, Cryptophyta, Centrohelida и Haptophyta образуют ряд независимых линий в основании Виконта.

Большинство амёбидных простейших, включённых в наш анализ, группируются в составе двух основных ветвей. Первая ветвь соответствует типу Amoebozoa, а вторая – группе, обозначенной на рисунке 1 как Rhizaria, включающей десмоторацидных солнечников, всех радиолярий, фораминифер и большинство филозных и ретикулозных амёб, за исключением Nucleariidae, которые относятся к Opisthokonta (Amaral Zettler et al., 2001).

### **Филогения ротосферидных солнечников и Discocristata**

Discocristata – одна из обширных групп простейших, выделенная по набору ультраструктурных признаков. Она включает одноклеточных и многоклеточных эукариот с жизненными формам гетеротрофных или фототрофных жгутиконосцев, амёб, солнечников и слизевиков. Филогенетическое положение и состав Discocristata остаётся спорным. Например, род *Stephanopogon*, первоначально описанный как примитивная инфузория, рассматривается либо как таксон высокого ранга внутри Discocristata (Gordon Leedale, Keith Vickerman, 2000), либо в составе Cercozoa (Cavalier-Smith, 2002). Для уточнения положения *Percolomonas* и *Stephanopogon*, впервые полученных в этой работе последовательности генов малой рРНК и актина *Percolomonas cosmopolitus*, *Stephanopogon apogon* и *S. colpoda*, были использованы для сравнения с основными таксонами дискокрисат, в том числе Euglenozoa и Heterolobosea, представленных семействами Schizopireniidae, Gruberellidae, Acrasidae. Результаты филогенетического анализа показывают (рис. 4), что последовательности *Stephanopogon* и *Percolomonas* группируются с высоким показателем статистической поддержки (ПВ=1.00). Эта группа оказывается внутри клады Heterolobosea. Принадлежность *Percolomonas* к Heterolobosea подтверждается и наличием характерной для Heterolobosea уникальной инсерции в рРНК (Wuyts, et al., 2001). Моделирование вторичной структуры этой области молекулы выявило, что вставленная последовательность представляет несовершенный палиндром, способный образовать дополнительную спираль 17\_1, положение которой соответствует положению неспаренного пуринового основания в составе стебля шпильки 17, имеющегося у представителей всех других доступных эукариотических таксонов (рис. 5).



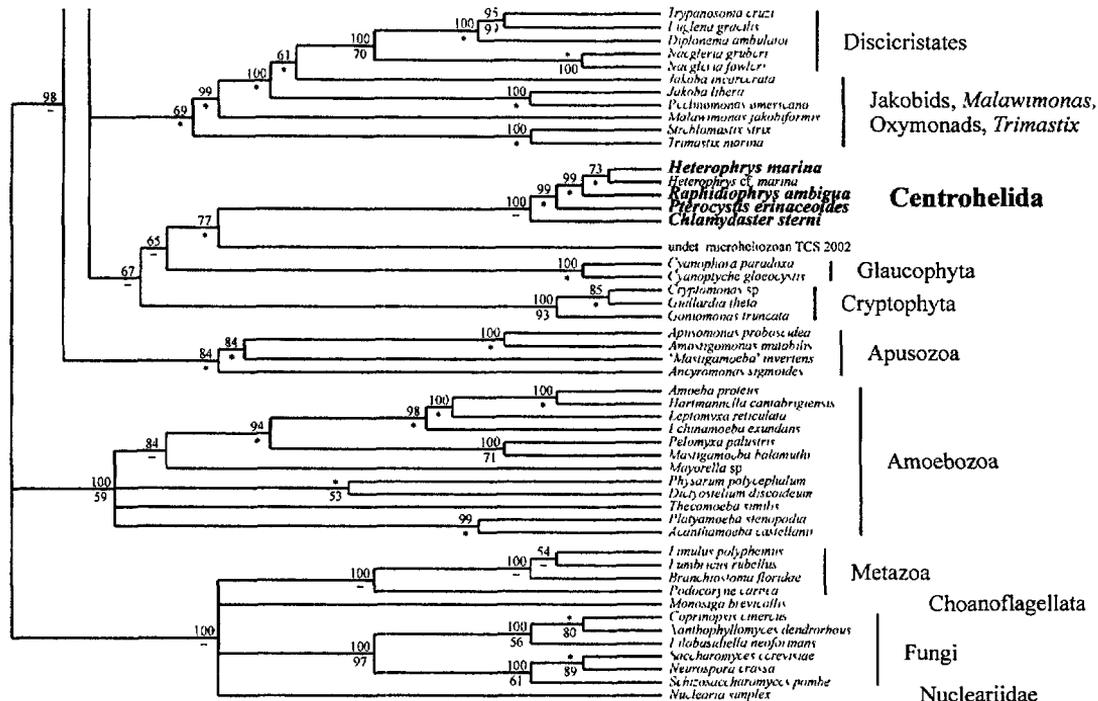


Рис 1. Супердерево, реконструированное с помощью программы RadCon при включении всех групп, представленных одновременно и на 18S, и на актиновом деревьях. Числа около узлов означают постериорную вероятность байесовского анализа с гамма – коррекцией 99 последовательностей 18S рРНК (сверху) и анализа МЕ с гамма – коррекцией 66 последовательностей актина (снизу). Звездочки означают, что рассматриваемый узел отсутствует на одном из деревьев в связи с различиями в наборе таксонов двух генов. Поддержка бутстрепа обозначена тире в тех случаях, когда она меньше 50%. Базальная трихотомия соответствует трем основным группам эукариот, предложенным недавним исследованием (Stechmann and Cavalier-Smith, 2002, Science, 297,89-91). Жирным помечены последовательности полученные в этой работе.

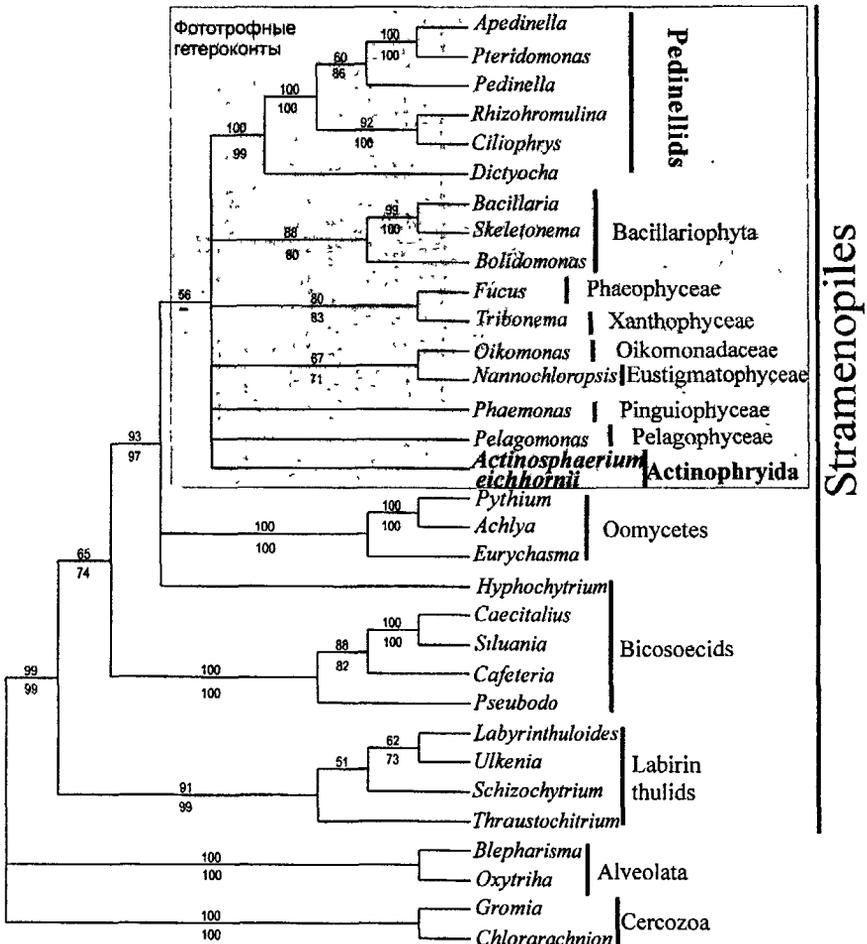


Рис. 2. Дерево 18S рНК, полученное методом ML анализа 32 полных последовательностей эукариот (1369 нуклеотидных позиций). Показанная топология выявлена с помощью программы PAUP\* с использованием модели GTR с учетом коррекции по скоростям эволюции и пропорции инвариантных сайтов с 8 категориями. Все параметры были установлены программой MODELTEST. Числа около узлов представляют поддержку бутстрепа при анализе ML (сверху) и NJ с гамма-коррекцией (снизу), с использованием 100 и 1000 реплик бутстрепа, соответственно. Поддержка бутстрепа не указана в тех случаях, когда она меньше 50%. Жирным помечены последовательности, полученные в этой работе.

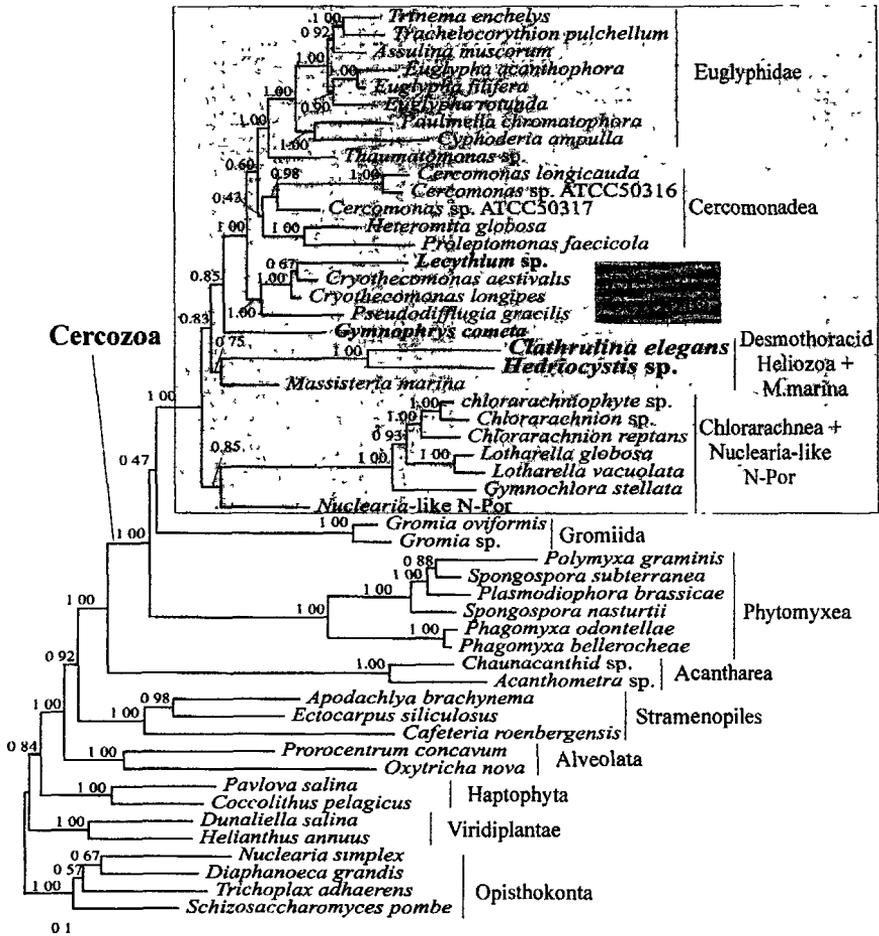


Рис. 3 Дерево 18S рРНК, полученное методом байесовского анализа 52 полных последовательностей эукариот (2741 нуклеотидных позиции). Показанная топология выявлена с помощью программы MrBayes с использованием модели GTR с учетом коррекции по скоростям эволюции и пропорции инвариантных сайтов с 8 категориями. Все параметры были установлены программой MODELTEST. Числа около узлов представляют значение постериорной вероятности при использовании 400000 реплик. Жирным помечены последовательности, полученные в этой работе.

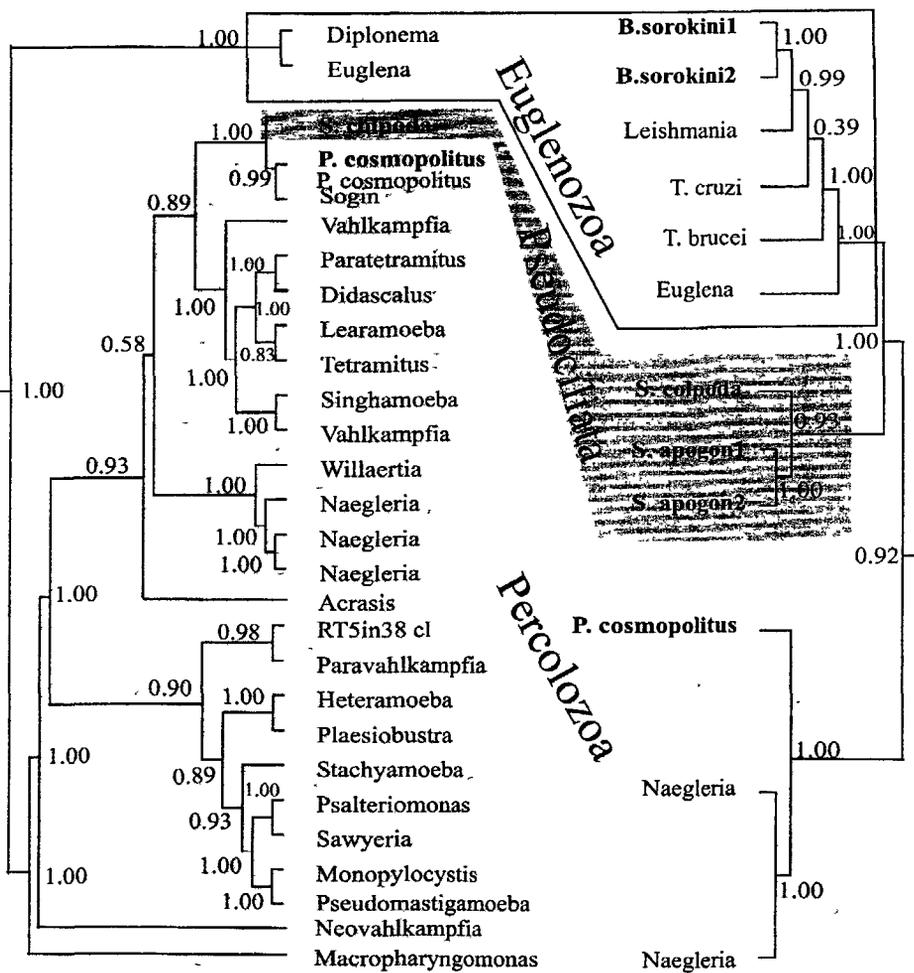


Рис 4 Деревья 18S рРНК (слева) и актина (справа) получены методом байесовского анализа. Показанная топология выявлена с помощью программы MrBayes с использованием моделей GTR (для 18S рРНК) и НММ (для актина) с учётом коррекции по скоростям эволюции и пропорции инвариантных сайтов с 8 категориями. Числа около узлов соответствуют значению постериорной вероятности. Укоренение обоих деревьев произведено по множественным внешним группам (не приведены)

Этот уникальный признак указывает на наличие тесных родственных связей между *Percolomonas* и *Heterolobosea* и обнаруживается во всех известных последовательностях таксона за исключением *Macropharyngomonas halophila*, представляющего самую базальную ветвь *Heterolobosea*.

Анализ актинового гена подтвердил родство *Percolomonas* и *Heterolobosea*. В противоположность этому, последовательности актина *Stephanopogon apogon* и *S. colpoda* дивергировали сильнее, что затрудняет выявление правильной топологии дерева. Так, на рисунке 4 видно, что *S. apogon* и *S. colpoda*, формируя монофилетическую ветвь, группируются с *Euglenozoa*. Однако в аминокислотных последовательностях актина *Euglenozoa* есть синаноморфные признаки, которые отсутствуют у *Stephanopogon* и других *Percolozoa* (рис. 6).

Филогенетический анализ последовательности 18S рДНК другого дискриктатного эвгленоидного жгутиконосца, обладающего набором уникальных морфологических признаков, приведших нас к описанию нового рода *Klosteria* Nikolaev & Mylnikov & Berney & Fahmi & Petrov & Pawlowski, 2003, выявил его положение в составе группы *Kinetoplastida*, сестринское по отношению к роду *Rhynchobodo* (данные не приведены).

Представители сем. *Nucleariidae*, входящего в состав отряда *Rotosphaerida*, не формируют монофилетической ветви, но ветвятся в разных частях эукариотического дерева. Положение *Micronuclearia podovernalis* не удается надежно определить ни на актиновом дереве, ни на дереве 18S рДНК. В зависимости от подборки таксонов и от применяемого филогенетического алгоритма, на дереве 18S рДНК *M. podovernalis* группируется с *Mastigamoeba invertans*, положение которой на дереве нестабильно, или с группой *Arusozoa*, или ветвится независимо в базальной части группы *Vikonta* (данные не приведены). Во всех случаях положение *M. podovernalis* на дереве гена 18S рДНК не имеет надёжной статистической поддержки.

Для того, чтобы проверить надежность объединения *Micronuclearia* и *Arusozoa* на актиновом дереве, мы определили первичную структуру актинового гена у представителя *Arusozoa*, *Amastigomonas*, который, по результатам анализа проявляет наибольшее сходство с актином *M. podovernalis*, однако положение этой группировки на дереве непостоянно: она может группироваться с *Arusozoa* или с гангиофитовыми водорослями, или с центрохелидами.



### Филогения *Multicilia marina*

Вид *M. marina* вначале был описан как организм, промежуточный между солнечниками и жгутиконосцами (Cienkowski, 1881), а позднее выделен в таксон высочайшего ранга - тип Multiflagellata (Mikrjukov, Mylnikov, 1996; 1998). Сравнение определённой нами первичной структуры гена 18S рРНК с большой базой данных, включающей широкое таксономическое разнообразие простейших, позволило выявить родственные связи *M. marina* с группой Амoebozoa. Более детальный анализ, проведённый в окружении большинства представителей типа, показал родство этого многожгутикового простейшего с амёбой *Gephyramoeba* sp. и пелобонтами. Этот результат наглядно иллюстрирует перспективность молекулярных методов в систематике простейших.

### Филогения *Gymnophrydium* sp.

*Gymnophrydium* sp. Dangeard – это голая филогенная ретикулоподиальная амёба, предполагаемое родство которой группе Cercozoa мы проверили молекулярными методами. Сравнение полученной последовательности гена 18S рРНК с базой данных, включающей основных представителей Cercozoa, позволило выявить родственные связи *Gymnophrydium* sp. с группой, включающей Foraminifera и *Gromia*.

## Обсуждение

### Полифилия солнечников

Данные о независимом происхождении солнечников Actinophryida, Centrohclida, Desmothoracida получены как при анализе генов 18S рРНК, так и генов актинов и служат свидетельством того, что солнечники представляют собой искусственный таксон, что согласуется с результатами ультраструктурных исследований (Smith, Patterson, 1986; Patterson, 1999; Mikrjukov, Patterson, 2001).

Различное происхождение отдельных групп солнечников подтверждает предположение, что их аксоподии - это не гомологичные структуры, но конвергентные адаптации, возможно, к пассивному хищничеству – основному способу питания большинства солнечников (Микрюков, 1998). Соответствие молекулярных и ультраструктурных данных, относительно филогенетических связей некоторых ветвей солнечников подтверждает важность ультраструктурного анализа для филогении простейших (Taylor, 1999).

Положение актинофриид на молекулярных деревьях подтверждает родство этой группы солнечников с группой пединеллидных хелиофлагеллят, показанное ранее

ультраструктурными исследованиями (Davidson, 1982; Smith, Patterson, 1986; Mikrjukov, Patterson, 2001). Актинофрииды и пединеллиды имеют ряд общих ультраструктурных признаков, таких как терминация аксонем на ядре, трубчатые кристы в митохондриях, экструсомы сходного строения (Mikrjukov, Patterson, 2001). В соответствии с молекулярными данными, актинофрииды и пединеллиды входят в состав группы Stramenopiles (Saunders et al., 1995; Sekigushi et al., 2002), но на данный момент их отношения лучше разрешаются с помощью ультраструктурного анализа, чем молекулярными методами. Анализ гена 18S рРНК, проведённый для 28 представителей Stramenopiles и включающий 1369 однозначно выровненных позиций, показал, что актинофрииды формируют ветвь внутри терминальной радиации автотрофных гетероконтных водорослей. Однако порядок ветвления между всеми линиями, составляющими эту группу, однозначно не установлен. Возможно, в последовательности рДНК актинофриид из-за необычно высокой скорости эволюции отсутствует сигнал, указывающий на близкое родство между пединеллидами и *Actinosphaerium eichhornii* (рис. 2). Несмотря на то, что последовательности гена актина строго поддерживают положение актинофриид среди Stramenopiles, создаётся такое впечатление, что эти гены не являются многообещающим филогенетическим маркером родственных отношений внутри группы, о чём свидетельствует отсутствие разрешения в порядке ветвления группы Oomycetes, бурых водорослей и различных видов актинофриид. Дальнейшее накопление сведений о первичной структуре белок-кодирующих генов актинофриид и пединеллид должно обеспечить лучшее разрешение филогенетических отношений между этими группами.

Ультраструктурные и молекулярные данные также согласуются друг с другом в случае десмоторацидных солнечников, которые напоминают представителей Cercozoa по наличию трубчатых крист в митохондриях и одинакового типа экструсом (Mikrjukov, 2000). На дереве 18S рРНК *Clathrulina elegans* и *Hedriocystis reticulata* находятся рядом с *Gymnophrys cometa* и *Massisteria marina*, амёбофлагеллятами со сложным жизненным циклом, включающем, как и у десмоторацид, двужгутиковую и амёбондную стадии. Таким образом, эти данные опровергают предположение К. А. Микрюкова о близком родстве гимнофриидных амёб центрохелидным солнечникам, но выявляют родство с другой группой солнечников - десмоторацидными (рис. 3). Анализ гена актина также подтверждает включение десмоторацид в состав Cercozoa, где они группируются вместе с другой базальной группой Cercozoa, хлорахнеофитовыми водорослями.

Ни ультраструктурные, ни молекулярные данные не смогли надежно установить происхождение центрохелид, которые по некоторым данным образуют независимую линию протистов (Cavalier-Smith, Chao, 2003). Этот результат подтверждается нашим анализом

актиновых последовательностей центрохелид, который показывает, что Centroheliozoa образуют независимую кладу вблизи групп Cryptophyta, Glaucophyta и Haptophyta. Результатами дистанционного анализа обычно является слабо поддерживаемая группировка Centrohelida + Haptophyta, реконструируемая по обоим генам - 18S рРНК и актина. Под группировку Centrohelida + Haptophyta трудно подвести морфологическую базу. Вместе с тем байесовский анализ с включением более широкого разнообразия таксонов эукариот поддерживает родственные отношения между Centrohelida, Cryptophyta и Glaucophyta, хотя и с небольшой постериорной вероятностью (67 %). Родство между Centrohelida и Cryptophyta невозможно однозначно исключить в связи с наличием некоторых общих морфологических черт у представителей обеих групп, таких как наличие кремниевых чешуек в покровах, отсутствие клеточной стенки и наличие пластинчатых крист в митохондриях.

### **Полифилия ротосферидных солнечников и структура Discocristata**

Уникальная форма крист в митохондриях, сходная с дисковидной (Микрюков 1999), объединяет филовых амёб сем. Nucleariidae и солнечниковидных амёб сем. Pompholyxophryidae в составе отряда Rotosphaerida, который в свою очередь является членом супергруппы Discocristata. Молекулярные данные для Rotosphaerida на данный момент представлены только последовательностями гена 18S рРНК (Amaral Zettler et al., 2001) и актина для рода *Nuclearia*. Ввиду того, что ультраструктурные характеристики Rotosphaerida, за исключением формы крист в митохондриях, варьируют в пределах группы (например, тип митоза), мы проверили её монофилию, секвенировав гены 18S рРНК и актина другого, сильно отличающегося по всем ультраструктурным признакам представителя Rotosphaerida, вида *Micronuclearia podovalis*. Для ответа на вопрос о принадлежности Nucleariidae и Rotosphaerida к группе Discocristata мы определили первичные структуры генов 18S рРНК и актина представителей неисследованного молекулярными методами таксона дискокрисат Pseudociliata и занимающего по некоторым предположениям базальное положение среди Percolozoa вида *Percolomonas cosmopolitus*.

Филогенетический анализ соответствующих генов этих видов в окружении репрезентативной выборки из представителей группы показал на дереве 18S рДНК наличие группировки, включающей *Percolomonas* и *Stephanopogon*, подтверждающая выдвинутую ранее гипотезу об их близости (Simpson, 1997), основанную на наличии сцепленных микротрубочек под всей поверхностью клеточной мембраны (исключая только участки около жгутиков и рта), дисковидных крист в митохондриях и отсутствии в жизненном цикле амёбоидной стадии. Анализируя выявленные в этой работе близкородственные связи между группировками *Percolomonas* + *Stephanopogon* и *Tetramitus* + *Vahlkampfia* в составе сем.

Vahlkampfiidae, можно отметить ряд общих черт в строении жгутиковой стадии *Tetramitus* и *Percolomonas*: 1) количество, характер расположения и функции жгутиков; 2) форма и размеры тела; 3) способ питания; 4) наличие вентральной борозды.

В связи с отсутствием репрезентативной базы данных по актинам дискокрystalных организмов и с аномально длинными ветвями, ведущими к видам *Stephanopogon*, актиновое дерево не полностью соответствует дереву 18S рРНК. Так, группировка *Naegleria* и *Percolomonas* подтверждает монофилию Percolozoa, а объединение видов рода *Stephanopogon* с Euglenozoa может быть следствием действия феномена притяжения длинных ветвей. Помимо этого мы выявили ряд синапоморфных для Euglenozoa признаков, которых нет, ни у Percolozoa, ни у Pseudociliata. На основании полученных нами результатов, а также их анализа в свете ультраструктурных данных, мы считаем, что роды *Stephanopogon* и *Percolomonas* являются ближайшими родственниками. Таксон, который они формируют, мы назвали Tubulocorticata, он входит в состав типа Percolozoa, сем. Vahlkampfiidae, а ближайшим предковой группой оказывается ветвь *Naegleria* + *Willaertia*. Анализ последовательностей генов 18S рРНК и актина *Micronuclearia podoventralis* однозначно опровергает монофилию группировки Rotosphaerida и Nucleariidae и говорит об отсутствии близкого родства между этим видом и *Nuclearia*. *M. podoventralis* не проявляет какого-либо родства с группой Discocristata, существование которого предполагал Микрюков (Микрюков, 1999). Эти два факта однозначно свидетельствуют, что дискоидные кристы в митохондриях появились в эволюции эукариот независимо как минимум 3 раза.

При анализе полученных генов *M. podoventralis* нами не выявлено чёткого сигнала, позволяющего локализовать положение на дереве этого загадочного простейшего. Очевидно, его происхождение связано с базальной радиацией эукариот. Ветви, ведущие к *M. podoventralis*, на обоих деревьях генов актина и 18S рРНК относительно короткие, что говорит о низкой скорости эволюции сё генома, и, как следствие, слабой подверженности влиянию артефактов при построении дерева. На 18S рРНК дереве *M. podoventralis* группируется с разными организмами с нестабильным положением, такими как виды Apusozoa, *M. invertans*, или ветвится независимо. На актиновом дереве *M. podoventralis* всегда группируется с представителем Apusozoa, *Amastigomonas* sp., внутри группы лобозных амёб. Не отрицая возможность группировки *M. podoventralis* + *Amastigomonas* sp, мы считаем ошибочным их положение среди амёб, т.к. это противоречит наличию у *Apusomonas* (ближайшего родственника *Amastigomonas*) характерного для представителей Bikonta слияния генов дегидрофолат редуктазы и тимидилат синтазы (Stechmann, Cavalier-Smith, 2002).

<i>Toxoplasma gondii</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	LDAG	RGSF
<i>Naegleria fowleri</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	LDAG	RGSF
<i>Naegleria gruberi</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	LDAG	RGSF
<i>Percolomonas cosmopolitus</i>	LYSSG	MDAGD	GYSLP	LDAG	RGSF
<i>Stephanopogon apogoni</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	MNAG	RGSEF
<i>Stephanopogon apogon?</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	MNAG	RGSEF
<i>Stephanopogon colpoda</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	MNAG	RLSEF
<i>Euglena gracilis</i>	LYSSG	LDCGD	GYSLP	IDMAG	RGLSF
<i>Bodo sorokinii</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	VDMAG	SGKTF
<i>Bodo sorokinii?</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	VDMAG	SGKTF
<i>Leishmania major</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	VDMAG	TGTF
<i>Trypanosoma brucei</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	VDMAG	TGTF
<i>Trypanosoma cruzi</i>	LYSSG	LDAGD	GYSLP	MDMAG	SGMTF

Рис 6 Локализация информативных молекулярных признаков Discocistata на фрагменте аминокислотного выравнивания актина. Предковое состояние признака показано для вида *Toxoplasma gondii*. Виды, последовательности которых получены в этой работе, обозначены жирным шрифтом.

### Положение *Multicilia marina*

Положение *M. marina* было определено в составе группы Amoebozoa с большой статистической поддержкой. Внутри Amoebozoa *M. marina* группируется с *Gephyramoeba* sp. и пелобриантами, входя, таким образом, в состав группы Conozoa (Archamoeba и Mucetozoa), что подтверждается наличием у исследуемой амёбы характерной для Conozoa кинетиды с конусом микротрубочек, своим широким концом противлежащим ядру. Положение *Multicilia marina* на дереве генов 18S рРНК среди Amoebozoa не противоречит гипотезе Кавалье-Смита, который в качестве типичной характеристики группы выделил признак уникальности (кинетиосома состоит из одного жгутика и одной центриоли), потому что исследованный нами организм также обладает этим признаком (Mikrjukov, Mylnikov, 1996; 1998).

### Положение *Gymnophrydium* sp.

Как и предполагалось на основании ультраструктурных признаков, *Gymnophrydium* sp. на основании последовательности гена 18S рРНК попадает в состав Cercozoa, при этом он оказывается ближайшим безраковинным родственником группы Foraminifera + *Gromia*. Представители новой морфологически столь разнородной группы обладают тем не менее рядом общих ультраструктурных признаков, например, наличием ретикулоподий с проходящими внутри них микротрубочками и отсутствием характерных для большинства групп Cercozoa стрекательных органелл.

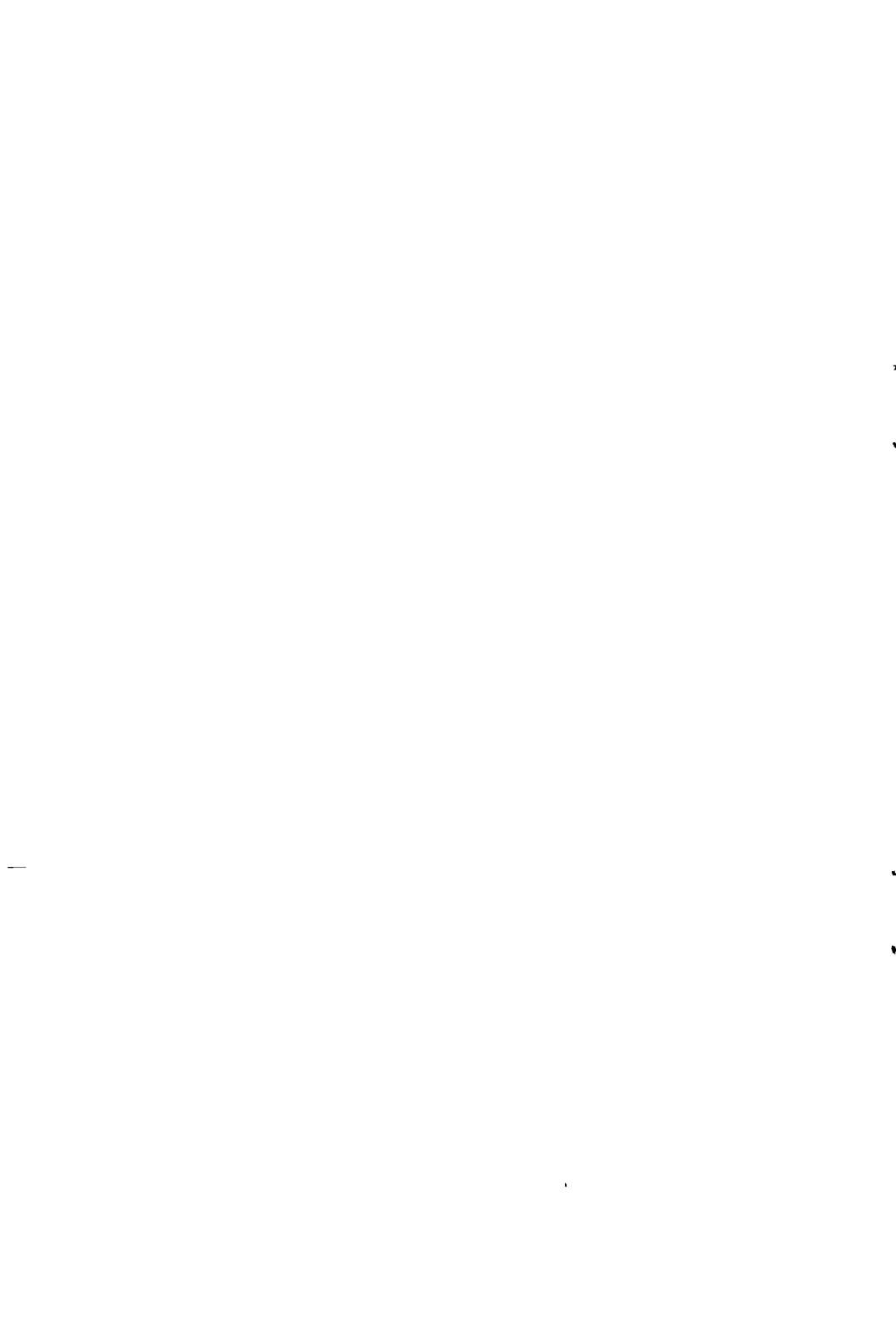
## Выводы

1. Гены 18S рРНК и актина являются высокоинформативными маркерами для филогенетических исследований солнечников и амебодных простейших в целом.
2. Топологии кладограмм, построенные на основании последовательностей генов 18S рРНК и актина, конгруэнтны и сходным образом отражают филогенетическую историю солнечников.
3. На основании филогенетических реконструкций с использованием генов 18S рРНК и актина установлена полифилия солнечников, а также выяснено положение ряда других организмов.
4. Определено филогенетическое положение основных групп «солнечников» на древе жизни: актинофриид – в составе Stramenopiles, десмоторацид – в составе Cercozoa, центрохелид – как из одной из групп высокого ранга, возникшей при базальной радиации Bikonta.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Nikolaev S.I., Berney C., Fahrni J., Mylnikov A.P., Aleshin V.V., Petrov N.B., Pawlowski J. *Gymnophrys cometa* and *Lecythium* sp. are core Cercozoa: Evolutionary implications. *Acta Protozool.* (2003) 42: 183-190.
2. Николаев С.И., Берней С., Фарни Ж., Мыльников А.П., Петров Н.Б., Павловский Я. Родственные отношения десмоторацидных солнечников и гимнофриидных амёб на основании сравнения последовательностей генов 18S рРНК. ДАН, (2003), том 393, № 4, с. 1-4.
3. Nikolaev S.I., Mylnikov A.P., Berney C., Fahrni J., Petrov N.B., Pawlowski J. The taxonomic position of *Klosteria bodomorphis* gen. and sp.nov. (Kinetoplastida) based on ultrastructure and SSU rRNA gene sequence analysis. *Protistologica* (2003) (in press).
4. Nikolaev S.I., Berney C., Fahrni J., Mylnikov A.P., Petrov N.B., Pawlowski J. The twilight of sun animalcules. Abstracts of the 4<sup>th</sup> European Congress of Protistology and 10<sup>th</sup> European Conference on Ciliate Biology, August 31 – September 5, 2003, san Benedetto del Tronto, Societa Italiana di Protozoologia, University of Camerino.
5. Николаев С.И. Анализ гена 18S рРНК *Percolomonas cosmopolitus* подтверждает монофилию типа Percolozoa. Тезисы VIII международной студенческой конференции год эгидой ЮНЕСКО «Ломоносов - 03» Апрель 20-23, Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

Отпечатано в копицентре «Учебная полиграфия»  
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.  
[www.stprint.ru](http://www.stprint.ru) e-mail: [zakaz@stprint.ru](mailto:zakaz@stprint.ru) тел 939-3338  
Заказ № 403 тираж 100 экз. Подписано в печать 29. 10. 2003 г.





2003-A  

---

18356

#18356