Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра зоологии беспозвоночных

Мезенцев Елисей Сергеевич

Разнообразие, систематика и филогения амёб семейства Thecamoebidae (Amoebozoa)

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных

Научный руководитель:

доцент, к. б. н. Смирнов А. В.

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

[**1. Введение** 3](#_Toc483564953)

[**2. Цель и задачи иследования** 5](#_Toc483564954)

[**3. Обзор литературы** 6](#_Toc483564955)

[**3.1 История изучения амёб семейства Thecamoebidae и его современное положение в системе лобозных амёб.** 6](#_Toc483564956)

[**3.2 Родовой состав семейства Thecamoebidae** 12](#_Toc483564957)

[Род *Thecamoeba* 12](#_Toc483564958)

[Род *Sappinia* 14](#_Toc483564959)

[Род *Stenamoeba* 17](#_Toc483564960)

[Рода *Pseudothecamoeba* и *Thecochaos* 17](#_Toc483564961)

[**3.3 Морфология и организация клетки представителей семейства Thecamoebidae** 19](#_Toc483564962)

[Локомоторная форма. 19](#_Toc483564963)

[Флотирующая форма 20](#_Toc483564964)

[Ядро 20](#_Toc483564965)

[Органеллы и цитоплазматические включения 21](#_Toc483564966)

[Покровы клетки 21](#_Toc483564967)

[**3.4 Экология и биоразнообразие.** 22](#_Toc483564968)

[**4. Материал и методики** 23](#_Toc483564969)

[**5. Результаты** 27](#_Toc483564970)

[**5.1 Описание выделенных штаммов** 27](#_Toc483564971)

[Штамм Ta 34, *Thecamoeba* sp. “similis-like” 27](#_Toc483564972)

[Штамм Ta 37, *Thecamoeba* sp. “similis-like”. 28](#_Toc483564973)

[Штамм Ta 43, *Thecamoeba* sp. 29](#_Toc483564974)

[Штамм Ta 51, *Thecamoeba* sp. 30](#_Toc483564975)

[Штамм Ta 55, *Thecamoeba similis* “similis-like” 31](#_Toc483564976)

[Штамм Ta 61, *Thecamoeba* sp. 32](#_Toc483564977)

[Штамм Ta 64, *Thecamoeba* sp.“aesculea-like” 33](#_Toc483564978)

[Штамм Ta 65, *Thecamoeba* sp.“similis-like” 34](#_Toc483564979)

[Штамм Ta 66, *Thecamoeba* sp.“similis-like” 35](#_Toc483564980)

[Штамм Ta 68, *Thecamoeba* n. sp.1“similis-like” 36](#_Toc483564981)

[Штамм Ta 69, *Thecamoeba* sp.“similis-like” 36](#_Toc483564982)

[Штамм Ta 70, *Thecamoeba* sp.“similis-like” 37](#_Toc483564983)

[Штамм Ta 72, *Thecamoeba* n. sp.1“similis-like” 38](#_Toc483564984)

[Штамм Ta 73, *Thecamoeba* sp. 39](#_Toc483564985)

[Штамм Ta 74, *Thecamoeba* sp. 40](#_Toc483564986)

[Штамм Ta 75, *Thecamoeba* n. sp.2 “quadrilineata-like” 40](#_Toc483564987)

[Штамм Ta 77, *Thecamoeba* sp. “striata-like” 41](#_Toc483564988)

[Штамм Ta 78, *Thecamoeba* sp.“aesculea-like” 41](#_Toc483564989)

[Штамм Ta 79, *Thecamoeba* sp. “striata-like” 42](#_Toc483564990)

[Штамм Ta 81, *Thecamoeba* sp. 42](#_Toc483564991)

[**5.2 Молекулярные данные** 43](#_Toc483564992)

[**6. Обсуждение** 45](#_Toc483564993)

[**Основные полученные результаты:** 50](#_Toc483564994)

[**7. Выводы** 50](#_Toc483564995)

[**8. Благодарности** 51](#_Toc483564996)

[**9. Список литературы** 52](#_Toc483564997)

# **1. Введение**

Лобозные амёбы семейства Thecamoebidae (Amoebozoa, Discosea, Thecamoebida) широко распространены в природе и известны из самых различных местообитаний - пресноводных, морских и почвенных. Часто они присутствуют в высевах проб, содержащих отмершие части растений. Благодаря сравнительно крупным размерам большинства их представителей (40 - 150 мкм) и относительно простому культивированию в лабораторных условиях текамебиды являются удобным объектом для цитологических работ и работ в области изучения амебоидного движения. Семейство Thecamoebidae – одно из немногих (если не единственное) семейство амёб, представители которого во многих случаях могут быть определены до вида на светомикроскопическом уровне, поэтому они потенциально могут являться удобным маркером при фаунистических и экологических исследованиях.

Амёб семейства Thecamoebidae легко распознать по характерной морфологии клетки – во время движения они не образуют дискретных псевдоподий. Тело их вытягивается по направлению движения, на поверхности образуются складки; некоторые представители имеют на дорсальной стороне хорошо заметные продольные гребни (количество гребней часто является определительным признаком). В передней части тела образуется широкая зона гиалоплазмы, нередко продолжающаяся на боковые стороны клетки. Сократительная вакуоль часто одна; обычно она смещается на задний конец клетки. В гранулоплазме отчетливо видно одно (роды *Thecamoeba* и *Stenamoeba*) или два ядра (род *Sappinia*) с разнообразными ядрышками (для многих видов строение ядрышка интерфазной клетки является определительным признаком), форма и количество ядрышек меняется во время и после митотического деления.

Первые представители семейства Thecamoebidae известны с конца XIX века (Carter, 1856), и были объектом активного изучения во второй половине XX века. Большинство представителей семейства описаны только с использованием светомикроскопических методов. Таким образом, ультраструктура, особенности биологии и пищевой спектр многих видов остаются неизвестными и требуют отдельного изучения. По мере развития методов световой микроскопии, уточнения стали требовать и многие морфологические данные.

Особый интерес вызывают представители центрального рода *Thecamoeba*, на котором нами было сконцентрирована большая часть нашего внимания. Многие типовые штаммы были утрачены из коллекций, а данные по ним фрагментарны и нуждаются в пополнении и подтверждении. Последнее монографическое описание рода *Thecamoeba* датировано 1977 годом и содержит только светомикроскопические данные, а для всего семейства ревизия не была выполнена никогда (Page, 1977).В тоже время текамебиды очень часто присутствуют в накопительных культурах, полученных из проб природных местообитаний, из чего можно полагать, что их видовое разнообразие остается недоисследованным.

Состав семейства и его систематическое положение менялись несколько раз, но в основе системы до недавнего времени лежали только морфологические признаки амёб. Фактически к этому семейству в разных классификациях относили всех уплощенных и обладающих более-менее упругим (на вид) клеточным покровом амёб. Некоторые текамёбо-подобные амёбы (например, *Pseudothecamoeba*, *Thecochaos*) так и не были надежно помещены ни в семейство Thecamoebidae, ни в какое-либо иное семейство. После внедрения в практику молекулярных методов, состав семейства в том смысле, в котором его подразумевал Пэйдж, претерпел большие изменения: часть родов, были распределены по другим семействам, в то время как некоторые представители других семейств были напротив включены в состав текамебид. В настоящей работе мы используем семейство Thecamoebidae в том составе, в котором оно установлено в современной системе амебоидных протистов (Smirnov et al. 2011).

В ходе наших работ по изучению биоразнообразия почвенных и наземных лобозных амёб мы обнаружили, что из наземных проб, содержащих отмершие части растений и верхний слой почвы, можно выделить неожиданно большое количество видов текамёб. Нами было выделено 33 штамма текамеб, содержащие 10 уникальных видов из разных географических точек. Некоторые можно определить как известные виды (*Thecamoeba aesculea, T. similis* и *T. quadrilineata*), однако есть несколько штаммов, которые вероятно являются новыми для науки видами. Филогенетические данные показывают, что в род *Thecamoeba* является монофилетической группой, однако в рамках рода можно выделить как минимум две крупные ветви, которые так же коррелируют с морфологическими признаками. Подобная находка позволяет приступить к работе по переисследованию известных видов, описанию новых видов и подготовке материалов для монографического описания семейства Thecamoebidae.

# **2. Цель и задачи иследования**

Цель работы: изучить биоразнообразие, систематику и филогению амёб семейства Thecamoebidae, собрать данные и подготовить материал для работы по переисследованию и монографическому описанию семейства.

Задачи работы:

1. Изолировать виды амеб относящихся к семейству Thecamoebidae из природных местообитаний, установить их в лабораторных культурах.
2. Изучить и идентифицировать изолированные штаммы методами световой микроскопии, при необходимости – подготовить материалы для последующего описания их как новых для науки видов.
3. Амплифицировать и секвенировать гены 18s рРНК выделенных штаммов и провести филогенетический анализ.
4. Сопоставить данные филогенетического анализа с данными по морфологии изолированных штаммов.

# **3. Обзор литературы**

## **3.1 История изучения амёб семейства Thecamoebidae и его современное положение в системе лобозных амёб.**

Семейство Thecamoebidae было установлено Шаффером в 1926 году и было им включено в состав подотряда *Amoeba* Ehrenberg, 1830 (Schaeffer, 1926). В момент установления группы в её состав вошли 2 рода: типовой род *Thecamoeba* Fromentel 1874 и установленный Шаффером в этой работе новый род *Rugipes*.

Диагноз, приведенный Шафером для семейства Thecamoebidae выглядел следующим образом: «Эти амёбы не образуют псевдоподий во время локомоции. В общих чертах локомоторная форма овальная до круглой с небольшими вариациями. Продольные гребни встречаются почти во всех видах» (Shaeffer, 1926, p. 83).

Как писал Шаффер «при нарушении», то есть при флотировании (по Page, 1977), амёбы рода *Rugipes* образуют «длинные псевдоподии и принимают истинно лучевую форму», что и является главным отличием их от представителей рода Thecamoebidae, однако при локомоции на субстрате особых отличий в локомоции представители обоих родов не имеют. Новый род включал в свой состав два вида: вид *R. vivax* и *R. bilzi*. Впоследствии этот род был расформирован, а его представители были перемещены в другие рода: *R. vivax* сначала включен Бови в 1965 году в новый род *Vannella* входящий в состав подсемейства Vannellina семейства Flabellulidae, затем Пэйджем в 1969 году в новый род *Platyamoeba* так же вошедший в состав подсемейства Vannellina (Bovee, 1965; Page, 1969). Дальнейшие изменения были привнесены Сойером в 1975 году, когда внутри семейства Thecamoebidae был создан новый род *Clydonella* и *R. vivax* было дано новое название *Clydonella vivax* (Sawyer, 1975). Вид *R. bilzi* был в итоге перенесен в состав рода *Thecamoeba* (Page, 1977), однако представители этого вида ни разу не были надежно реизолированы из природных местообитаний и таксономический статус его остается неясным.

В первой половине XX века было опубликовано большое количество работ, предлагающих разнообразные системы амёб, все они базировались на том или ином способе анализа морфологических признаков амёбоидных организмов (Averintzev S., 1906; Schaeffer, 1926; Kudo, 1939; Raabe, 1948; Hall, 1953; Reichenov, 1953). Попытку создать принципиально новую систему предпринял в 1952 году Сингх (Singh, 1952) и далее развил в 1953 году Шаттон. Он разделяет всех амёб на два новых подотряда: Mastigogenina («со жгутиковой стадией») и Amastigogenina («без жгутиковой стадии»), а в качестве одного из основных признаков использует паттерн деления ядра клетки. Так же Шаттон повысил таксон Amoebaea до ранга отряда, а отряд Lobosa до ранга класса в составе суперкласса Rhizopoda. В этой системе семейство Thecamoebidae вошло в состав подотряда Amastigogenina, при этом его родовой состав не изменился (Chatton, 1953).

В начале второй половины XX века в серии работ Бови и Яна система амёб вновь претерпела существенные изменения (Bovee, 1954, 1970, 1972; Bovee and Jahn, 1960, 1965, 1966; Jahn and Bovee, 1965; Jahn et al., 1974). В их системе 1966 года голые лобозные амёбы в рамках надотряда Lobida были разделены на три отряда. Основным определительным признаком при разделении отрядов был механизм амебоидного движения. Семейство Thecamoebidae было единственным входившим в состав подотряда Rugina нового отряда Thecida. Помимо изменения положения в системе, так же изменяется и состав семейства, в котором остается только род *Thecamoeba*, а род *Rugipes* был переведен в состав сестринского семейства Striamoebidae. Диагноз семейства Thecamoebidae совпадает с диагнозом подотряда и выглядит следующим образом: «Крупные амёбы, образующие большое количество складок во время движения. Складки расположены на дорсальной стороне и расположены более менее параллельно. Псевдоподии представляют собой только тупые выросты» (Bovee and Jahn, 1966, p. 233; Jahn et al., 1974, p. 430). Состав рода *Thecamoeba* так же был сильно изменен: многие виды, ранее входившие в состав рода, были включены в состав нового рода Striamoeba семейства Striamoebidae подотряда Striatina. Подотряд Striatina также как и подотряд *Rugipes* входил в состав отряда Thecida. Диагноз семейства Striamoebidae, идентичный диагнозу подотряда Striatina, почти повторяет диагноз семейства Thecamoebidae, единственным различием между семействами и соответственно подотрядами является размерная характеристика - амёбы делятся на крупных (Thecamoebidae) и мелких (Striamoebidae). Однако четкой границы в размерах между «крупными» и «мелкими» амёбами не было указано. (Bovee and Jahn, 1966; Jahn et al., 1974). Таким образом, при всех нововведенных таксонах и сохранившихся старых таксонах в этих работах представители рода *Thecamoeba* были распределены по разным группам, но уже даже не в составе семейства, а в рамках отряда Thecida.

Следующим этапом в развитии системы амёб была работа Пэйджа 1976 года (Page, 1976). Отряду Thecida Пэйдж в своей работе дает ранг подотряда в составе отряда Amoebida. Семейство Thecamoebida стало единственным в таксоне Thecida, вернувшее в свой состав перенесенных в состав семейства Striamoebidae представителей рода *Thecamoeba*. Так же изменился и состав: по предложению Пэйджа в семейство включены рода: *Thecamoeba*, *Sappinia*, *Platyamoeba*, *Pessonella*, *Vannella*. Род *Sappinia* был включен Пэйджем в состав семейства после публикации работы посвященной морфологии и ультраструктуре *Sappinia* *diploidea* (Goodfellow et al., 1974). Род *Rugipes* к тому времени был уже практически расформирован. Как упоминалось ранее, *R. vivax* в работе Пэйджа 1969 года был перемещён в состав рода *Platyamoeba* Page 1969, куда он попал после работы Бови и Яна 1965 года, в которой этот вид был внесен в состав нового рода *Vannella* Bovee and Jahn 1965. Так же осталось неясным и положение вида *R. bilzi*, который предполагалось перенести в другой род, что и было сделано Пэйджем в 1977, где он вносит данный вид в состав рода *Thecamoeba*. Таким образом, в системе Пэйджа 1976 года семейство включает в себя всех представителей предложенных ещё Шаффером, но с перемещением внутри семейства видов расформированного рода *Rugipes*. Так же добавляя в состав семейства рода, представители которых во время локомоции не имеют дискретных псевдоподий. Не смотря на выделение в отдельную группу рода *Vannella* в работе Бови 1970 года. Предложенный Пэйджем в 1976 году диагноз семейства повторяет диагноз, предложенный им для подотряда Thecida: «Сплющенные, часто продолговатые, яйцевидные или вееровидные, более-менее постоянной формы; с выраженным гиалиновым слоем; возможны отчетливые гребни; большинство видов не образуют разветвлений; форма деления ядра разнообразна» (Page, 1976, p.67).

Дальнейшая работа Пэйджа над классификацией амеб опять привела к изменениям в положении и составе семейства. В работе 1987 года семейство было перенесено в таксон Euamoebida Lepsi 1960, ставший по предложению Пэйджа отрядом (Page, 1987). Из семейства были исключены рода: *Platyamoeba*, *Pessonella* и *Vannella*. В частности *Vannella* вновь была возвращена в собственное семейство Vannellidae, как в более ранней работе Бови 1970 года. Так же в состав семейства были включены новые: *Dermamoeba* и *Thecochaos*. Таким образом, родовой состав семейства в работе был таким: *Thecamoeba*, *Sappinia*, *Dermamoeba*, *Thecochaos*. Пэйдж приводит новый вариант диагноза семейства Thecamoebidae: «Уплощённые, с более менее регулярными очертаниями; как правило, продолговатые, моноподиальное за редким исключением, часто с заметным пелликула-подобным слоем, который может быть отчетливо морщинистый; гиалоплазма обычно в виде глубокого фронто-латерального полумесяца. Обычно одноядерные; один род двуядерный и один многоядерный; ядрышковый материал разнообразный. Нет цитоплазматических кристаллов. Поверхность покрыта толстым, аморфным гликокаликсом или кутикулой (один род). Выраженная фиброзная ядерная ламина известна у некоторых видов» (Page, 1987, p. 205).

В 1988 году Пейдж (Page 1988) создал в составе семейства Thecamoebidae новый род *Pseudothecamoeba*, в который вынес описанный им ранее своеобразный вид *Thecamoeba proteoides* Page, 1978 (как *Pseudothecamoeba proteoides*).

В 1993 году Смирнов и Гудков (Смирнов и Гудков 1993) установили в составе семейства род *Paradermamoeba*. В работе 1994 (Smirnov and Goodkov 1994) года они привели исправленный диагноз семейства Thecamoebidae: “Уплощённые амебы с более или менее регулярным очертаниями, моноподиальные за редким исключением. На светомикроскопическом уровне поверхность часто выглядит как пелликула-подобный слой, который может быть выраженно складчатым. Гиалоплазма в виде глубокого антеро-латерального серпа, иногда с длинными боковыми продолжениями, идущими до заднего конца тела амебы, однако фронтальная зона гиалоплазмы никогда не занимает половину или более длины тела клетки. Строение ядра различное, в цитоплазме нет кристаллов.

В разное время в состав семейства так же были включены такие рода как: *Clydonella* Sawyer, 1975, *Lingulamoeba* Sawyer, 1975, *Paradermamoeba* Smirnov and Goodkov, 1993, *Pessonella,* Pussard, 1973, которые в дальнейшем разными авторами были перенесены в другие семейства (см. Smirnov and Goodkov, 1994).

Дальнейшие изменения семейство претерпело после серии молекулярных работ (Adl et al., 2005; Smirnov et al., 2007; Smirnov et al., 2011). На основании совокупности морфологических и молекулярных данных роды *Dermamoeba* и *Paradermamoeba* из состава семейства Thecamoebidae был вынесены в отдельное семейство Dermamoebidae, так же на основе молекулярных данных в состав семейства вошёл род *Stenamoeba*, содержащий виды, ранее находившиеся в составе рода *Platyamoeba* семейства Vannellidae. Диагноз семейства Thecamoebidae идентичен диагнозу отряда Thecamoebida: «Амёбы с плавными очертаниями, продолговатые, стриатные или морщинистые, с широким полумесяцем гиалинового слоя. Клеточная поверхность складчатая, часто с продольными гребнями на дорсальной стороне. Гликокаликс тонкий, плотный, аморфный» (Smirnov et al, 2011, p. 565).

Дальнейшие молекулярные работы не привнесли изменений в состав и положение семейства Thecamoebidae. В настоящей работе мы используем классификацию амеб, предложенную Смирновым в 2011 году (Smirnov et al., 2011). Систематическое положение родов *Pseudothecamoeba* и *Thecochaos* не ясно и требует проверки, поэтому в этой работе рода *Pseudothecamoeba* и *Thecochaos* рассматриваться в составе семейства не будут. Однако оба эти рода рассмотрены в рамках обзора литературы настоящей работы. В качестве системы семейства Thecamoebidae, за основу взята система, предложенная в работах Пэйджа (Page 1977) и Смирнова с соавторами (Smirnov et al., 2011) с дальнейшими изменениями, обусловленными открытием новых видов (Таблица 1).

Таблица 1. Система амёб семейства Thecamoebidae, принятая в нашей работе:

Class Discosea Cavalier-Smith in Cavalier-Smith et al., 2004

Subclass Longamoebia Smirnov and Cavalier-Smith, 2011

Order Thecamoebida Smirnov and Cavalier-Smith, 2011

Family Thecamoebidae Schaeffer, 1926

Genus *Thecamoeba* Fromentel, 1874

*T. aesculea* Kudryavtsev and Haussmann, 2009

*T. hilla* Schaeffer, 1926

*T. munda* Schaeffer, 1926

*T. quadrilineata* Carter, 1856

*T. orbis* Schaeffer, 1926

*T. similis* Greeff, 1891

*T. sphaeronucleolus* Greeff, 1891

*T. striata* Penard, 1890

*T. terricola* Greeff, 1866

*T. verrucosa* Ehrenberg, 1838

Genus *Sappinia* Dangeard, 1896

*S. diploidea* Hartmann, 1908

*S. pedata* Dangeard, 1896

*S. platani* Wylezich et al., 2015

Genus *Stenamoeba* Smirnov et al., 2007

*St. amazonica* Dycová, 2007

*St. berchidia* Geisen, 2014

*St. limacina* Dycová, 2007

*St. stenopodia* Page, 1969

*St. sardiensis* Geisen, 2014

## **3.2 Родовой состав семейства Thecamoebidae**

### Род *Thecamoeba*

При движении амёбы, входящие в состав рода *Thecamoeba*, уплощенные, контур клетки принимает форму от сильно вытянутой овальной до круглой, в зависимости от скорости, в некоторых случаях каплевидной формы. Для ряда представителей описана так называемая пирамидальная локомоторная форма, при которой задний конец клетки поднят над субстратом и сужается под острым углом. Задний конец клетки часто не несет выраженных уроидных структур. На переднем конце хорошо заметен гиалиновый слой в виде широкого полумесяца, который продолжается по бокам и иногда истоньшаясь доходит до заднего конца. На поверхности клетки хорошо заметны многочисленные ругозные складки и продольные гребни, характерные для разных представителей рода *Thecamoeba*  (Page 1977). Представители этого рода амеб принадлежат к стриатному и ругозному морфотипам (Smirnov and Goodkov 1999; Smirnov and Brown 2004). Все известные представители рода *Thecamoeba* одноядерные. Форма и количество ядрышек в пределах рода очень разнообразны и являются хорошим признаком при определении видов. Гликокаликс аморфный. Цисты у представителей рода *Thecamoeba* не описаны (Page, 1971; Page, 1977; Page and Blakey, 1979; Page, 1983; Smirnov, 1999; Kudryavtsev and Hausmann, 2009).

Род *Thecamoeba* был установлен Фроментелем в 1874 году, в этой работе автор в состав рода включает один вид - *T. quadripartita*. В этой же работе имеется описание и другого вида, который позднее будет включен в состав рода *Amoeba* (=*Thecamoeba*) *verrucosa*. *Thecamoeba* quadripartita считается типовым видом рода *Thecamoeba*, однако по описаниям Фроментеля сложно установить какие именно амёбы относятся к данному виду. Описывая *Thecamoeba* *quadripartita* , он говорит об «амёбе в доспехе», который «разделен на четыре продольные части, и каждая из частей движется по разделительной линии как на шарнире». Описаний ядра Фроментел в работе не приводит, и по его рисункам сложно достоверно сказать какая из изображенных структур является ядром. Пэйдж в своей монографии не выражает надежд на то, что когда-нибудь вид, являющийся типовым для *Thecamoeba*, будет когда-либо подробно описан.

Некоторые представители рода *Thecamoeba* были описаны еще до работы Фроментеля, такие как упомянутая выше *Amoeba* *verrucosa* Ehrenberg, 1838. Количество подробно описанных видов в роду *Thecamoeba* выросло после серии работ Грифа и Пенарда по исследованию «амёб с пленкой» (Greeff, 1866, 1891; Penard, 1902, 1905, 1913). Согласно работам Пэйджа 1971 и 1977 годов, которые, по сути, являются монографией по представителям рода *Thecamoeba*, известно около 18 видов, которые могут принадлежать к роду *Thecamoeba*. Так же Пэйдж указывает, что в своих работах он не упоминает некоторые «виды», связывая это с тем, что их описание является сомнительным, и считает, что эти названия должны быть забыты.

Было предпринято несколько попыток выделить внутри рода несколько групп, об этих предложениях так же пишет Пэйдж в работе 1977 года (Page 1977). Одна из попыток разделить род *Thecamoeba* была описана выше: в классификации Бови и Яна 1966 года, когда даже не род был разделен на подгруппы, а разные представители рода были распределены между двумя подотрядами отряда Thecida. Исходя из диагнозов подотрядов основным признаком, по которому произошло разделение это размерная характеристика. Однако при анализе составов представителей попавших в разные подотряды заметно, что в одну группу попали амёбы, образующие во время движения большое количество разнонаправленных складок и относящихся к ругозному морфотипу. В то время как во вторую группу попадают амёбы образующие на дорсальной поверхности продольные параллельные ходу движения складки и таким образом принадлежащие ругозному морфотипу. Схожую идею выдвигает Пэйдж (Page 1977). По мнению Пэйджа род *Thecamoeba* можно разделить на три группы по морфологии локомоторной формы. Первая группа «verrucosa-like» включает амёб, поверхность которых во время движения покрыта большим количеством разнонаправленных складок и морщин. Название этой группы схоже с видовым эпитетом *Thecamoeba* *verrucosa*, которую Пэйдж включает в состав группы. По схожему принципу получает название и вторая группа «striata-like», получив название от *Thecamoeba* *striata*, вторая группа включает в состав виды, представители которых при локомоции имеют плавные очертания, практически не имеют морщин, и дорсальная поверхность которых часто несет несколько продольных гребней во время движения. В третью группу в работе 1977 года входит только один вид - *T. proteoides*, на основе которого в 1988 году Пэйдж создал род *Pseudothecamoeba*, история изучения которого будет еще описана ниже.

Ещё один вариант разделения рода *Thecamoeba* на группы был предложен Пуссардом в 1973 году (Pussard 1973). По его мнению, роды амеб с различными паттернами митоза не могут принадлежать к одному семейству. Так же род должен включать только тех представителей, которые сходны по внешним признакам. Исходя из этих правил, Пуссард заключает, что род *Thecamoeba* совершенно противоречит правилу однородности и расщепление рода неизбежно. Пэйдж также отмечает разнице в митотических картинах разных видов *Thecamoeba*, но не разделяет род на основе этого признака. В 1982 году Сингх предложил разделить род *Thecamoeba* на 8 независимых родов на основе паттерна митоза клетки и строения ядра (Singh and Hamemaiah, 1979; Singh et al. 1982), однако это предложение не нашло поддержки в работах других исследователей.

Молекулярные исследования показали, что виды рода *Thecamoeba* формируют монофилетическую группу, однако дивергенция сиквенсов гена 18S рРНК у них очень высока. Текамебы представляют собой одну из самых длинных ветвей в филогенетическом древе Discosea (Fahrni et al. 2003; Michel et al. 2006; Smirnov et al. 2011). В Генбанке на настоящий момент находятся сиквенсы гена 18S рРНК трех видов текамеб (*T. similis, T. aesculea* и *T. quadrilineata*) и одного непоименованного штамма (Pra-35). Доступны также сиквенсы генов актина и бета-тубулина некоторых штаммов и транскриптомные данные по виду *T. quadrilineata* и неидентифицированному штамму, обозначенному как *Thecamoeba* sp. (Tekple et al. 2016; Kang et al. 2017).

Диагноз рода *Thecamoeba* приведен в работе Пэйджа и Блаки (Page and Blakey, 1979) и звучит следующим образом: «уплощенные овальные или вытянутые (клетки), длина редко превышает ширину более чем в 4 раза, с продольными поверхностными гребнями и «впечатлением» наличия пелликулы при светомикроскопическом наблюдении. Гиалоплазма обычно формирует серп на переднем конце клетки, обычно – с узкими латеральными продолжениями вдоль боковых сторон клетки. У большинства видов отсутствуют дискретные псевдоподии, клетки у большинства видов не ветвятся, обычно одноядерные, с различной структурой ядра у разных видов, толстый гликокаликс, обычно 20 нм или более».

### Род *Sappinia*

Род *Sappinia* с единственным видом *Sappinia* *pedata* был установлен Дангердом в 1896 году для свободноживущих, обычно двуядерных амеб с плотным гликокаликсом (Dangeard 1896). В культурах, выделенных из конского навоза, Дангерд обнаружил белые пятна, которые под микроскопом появились как конгломераты многочисленных особей амеб, но без слияния клеток, как в типичных плазмодиях. Дангерд утверждал, что они каким-то образом напоминают миксамеб, но обладали очень своеобразным спорообразованием, обычно без дифференцировки в ножку и спорангий, все споры развиваются в миксамебу. Однако при определенных условиях он наблюдал образование очень длинной ножки, аналогично образованиям у *Copromyxa protea*. С другой стороны, трофозоиты также напоминали представителей «*Amoeba limax*», с типичной сократительной вакуолью. Некоторые особи были в 3-4 раза больше среднего размера. То, что он нашел наиболее примечательным в этой амебе - это картина деления ядра, при котором ядро «делится на два близко расположенных ядра; иногда образовывались даже четыре ядра». Он предположил, что фактически ядро только одно, потому что он наблюдал определенный процент одноядерных клеток в каждой культуре, однако в большинстве случаев ядра были постоянно в процессе деления, так что обычно две ядра были замечены внутри одной клетки. Он не заметил сокращения или растяжения ядра при делении, ядро просто становилось продолговатым, и масса хроматина разделилась на две части. Он также отметил, что ядерная мембрана остается неповрежденной на протяжении всего деления, причем оба дочерних ядра восстанавливают мембрану после деления. Подобный тип деления уже был описан для некоторых других амеб (Gruber, 1883). Цисты по описанию Дангерда имели ножку, длина ножки у разных цист была различной.

Второй вид - *Sappinia* diploidea, был первоначально описан как *Amoeba* *diploidea* Хартманном и Неглером в 1908 году из толстой кишки ящерицы *Lacerta agilis* (Hartmann and Nägler 1908). Для Хартманна и Неглера наиболее примечательной особенностью *Sappinia* (*Amoeba*) *diploidea* было то, что гаплоидные ядра остаются автономными в течение всего жизненного цикла, таким образом, давая диплоидную клетку. Они описали процесс деления клетки *S.* *diploidea* как автогамию, которая включает слияние двух «гаметных ядер одного отдельного индивида после редукционного деления полового ядра». В нормальном клеточном делении, которое происходит на стадии трофозоита, ядра не сливаются во время накопления, а делятся одновременно. Дальнейшим исследованием *S. diploidea* была работа Неглера 1909 года, в которой он более подробно описал деление ядер (Nägler 1909). По его мнению, это не было амитотическое деление, поэтому он установил новый термин промитоз, определенное делением кариосомы, которое по его предположению довольно распространено среди амёб. Он отмечал морфологическое сходство *S. diploidea* с другими почвенными амебами, как «*Amoeba alba*», которое состояло в четком разделении эктоплазмы и эндоплазмы и довольно плотных покровах, единственным серьезным отличием было наличие двух ядер. Неглер указал, что у *S. diploidea* ядра сплющиваются там, где они соприкасаются, и что ядерные мембраны сильнее окрашиваются в этой области, что указывает на подобные диктиосомам структуры, что позднее подтверждалось с помощью электронной микроскопии в работах Гудфелоу с соавторами 1974 года и Митчелла с соавторами 2006 года (Gooedfellow et al. 1974; Michell et al. 2006). Неглер отмечает, что после 2-3 недель культивирования две амёбы инцистируются в пределах одной цисты и затем сливаются.

В 1912 году Алексеев включил *Amoeba diploidea* в состав рода *Sappinia*. Позднее в работе Хартманна и Шиллинга 1917 года был подробно описан процесс конъюгации, которые они описали, основываясь на информации об этом процессе в работе Неглера 1915 года. Не смотря на работу Алексеева, они продолжают называть изучаемый вид *Amoeba* *diploidea*. Как пишут авторы, после образования общей цисты два гаплоидных ядра каждой клетки сливаются. После чего сливаются сами клетки. Затем происходит редукционное деление каждого из уже диплоидных ядер. Затем три из четырех гаплоидных ядер, получившихся в результате деления каждого ядра, дегенерируют, а оставшиеся ядра сближаются и держатся рядом без слияния, как у трофической стадии амёбы.

Несмотря на подробное описание полового процесса, разными авторами в начале XX века вопрос о наличии полового процесса у представителей рода *Sappinia* остается открытым.

Модекулярные исследования показали, что виды, входящий на настоящий момент в состав рода *Sappinia*, образуют монофилетическую группу и являются сестринской к роду *Thecamoeba* (Wylezich et al., 2015). В базе Генбанка присутствуют последовательности гена 18s рРНК для всех известных представителей рода. На настоящий момент в состав рода входят три вида.

Диагноз рода. Представители рода *Sappinia* принадлежит к языковидному морфотипу (Smirnov and Goodkov 1999; Smirnov and Brown 2004). В цитоплазме два ядра, каждое из которых содержит одно крупное центрально расположенное ядрышко. Ядра свободно перемещаются вместе с токами гранулоплазмы и обычно располагаются близко друг к другу. Гликокаликс аморфный, у *Sappinia* *platani* на поверхности гликокаликса описаны волосовидные структуры (Goodfellow et al., 1984; Wylezich et al., 2015). Представители рода *Sappinia* образуют цисты, лежащие на поверхности субстрата (*S. diploidea, S. platani*) или приподнимающиеся над субстратом на ножке (*S. pedata*). Обычно цисты образуются одной или двумя клетками.

### Род *Stenamoeba*

Во время локомоции клетки этих амеб обычно уплощенные, вытянутые. Представители рода *Stenamoeba* принадлежат к языковидному морфотипу (Smirnov and Goodkov 1999; Smirnov and Brown 2004). Единственное везикулярное ядро при локомоции всегда находится на границе гиалоплазмы и гранулоплазмы. Гликокаликс аморфный. В старых культурах представители рода *Stenamoeba* образуют шарообразные одноядерные цисты с гладкой внутренней и более тонкой слегка морщинистой наружной стенкой. Эксцистирование происходит в результате разрыва стенки цисты.

Первый представитель рода *Stenamoeba* (=*Platyamoeba*) *stenopodia* был описан в 1969 году Пэйджем и отнесен в семейство Thecamoebidae, хотя Пэйдж ставил под сомнение систематическое положение этого вида (Page, 1969). В более поздней системе Пэйджа 1987 год *Platyamoeba* вместе с родом *Vannella* были включены в состав семейства Vanellidae (Page, 1987). В 2007 году на основании молекулярных данных вид *Platyamoeba stenopodia* был перенесен в семейство Thecamoebidae с изменением родового названия на *Stenamoeba* (Smirnov et al., 2007). Позднее в 2010 и 2014 годах было описано ещё 4 новых вида, включенных по молекулярным данным, в состав рода *Stenamoeba* (Dyková et al., 2010; Geisen et al., 2014).

Диагноз рода *Stenamoeba*, приведенный в работе Смирнова с соавторами (Smirnov et al. 2007) звучит следующим образом: «узкие, вытянутые, языковидные амебы с большой фронтальной зоной гиалоплазмы, занимающей около половины клетки. Обычно имеются несколько параллельных продольных гребней и латеральных складок, но гребни никогда не стабильны в течение длительного времени. При локомоции единственное ядро обычно располагается на границе между гиалоплазмой и гранулоплазмой. Цисты с одиночной стенкой, гликокаликс тонкий, аморфный».

### Рода *Pseudothecamoeba* и *Thecochaos*

Виды, позднее внесенные в состав рода *Thecochaos*, впервые были описаны Грифом в 1891 году. В работе Грифа видам было дано название *Amoeba* *fibrillosa* и *Amoeba* *alba*. Позднее эти виды были упомянуты в работах Пенарда 1902 и 1913 годов. Также Пенардом были изготовлены постоянные препараты обоих видов, на основе которых Пэйдж в 1981 году провел переописание обоих видов и предложен род *Thecochaos*. Такое название было создано путем сложения названий двух известных родов: *Thecamoeba* и *Chaos* – амёб из группы Amoebidae, характерной чертой которых является многоядерность. Пэйдж в своей работе ставит под сомнение идентичность описываемых Пенардом и Грифом *Amoeba* *alba*, предполагая, что амёбы описанные Грифом под этим именем относятся к роду *Leptomyxa*. Эти сомнения так же вызваны тем, что Гриф приводит только текстовое описание не оставив иллюстраций для *A. fibrillosa* и *A. alba*. В свою очередь, текстовое описание Грифа для *A. fibrillosa* соответствует, по мнению Пэйджа, с представленными на препаратах Пенарда амёбами.

По описанию Пэйджа контур клетки обоих представителей обычно неровно овальный во время движения, клетки вытянутые по направлению локомоции, с хорошо выраженным фронтальным полумесяцем гиалоплазмы. Во время перемещения не образуют дискретных псевдоподий, а дорсальная поверхность несет складки и гребни. Единственное описанное «ветвления» клетки упоминается в связи с резким изменением направления движения. Описание представителей нового рода совпадает с таковым для текамёб, единственным отличием в описании клеток является присутствие в цитоплазме многочисленных ядер, количество которых у отдельных представителей доходит до 100. И Пэйдж в данной работе, устанавливая диагноз для нового рода *Thecochaos*, дает им следующую характеристику: «По большому счету многоядерные *Thecamoeba*».

Молекулярных данных по представителям этого рода амеб нет.

Ещё один род, который Пэйдж помещал в состав семейства Thecamoebidae, это род *Pseudothecamoeba* Page, 1988. Впервые описание представителя этого рода было дано в монографической работе Пэйджа 1977 года об амёбах рода *Thecamoeba*. С неё началось подробное изучение типового вида рода *Pseudothecamoeba*, которому при первом описании было дано имя *Thecamoeba* *proteoides*. В серии работ по изучению центрального вида *Thecamoeba* (=*Pseudothecamoeba*) *proteoides* Пэйдж неоднократно указывал сходство данного вида с представителями группы Amoebidae по манере движения, но при этом упоминая так же и многочисленные складки на поверхности клетки, характерные для представителей рода *Thecamoeba*. По описанию Пэйджа во время локомоции клетки сильно вытягиваются по направлению движения, принимая очертания характерные для моноподиального морфотипа. Так же во время движения клетки *Ps. proteoides* могут ветвиться, напоминая по локомоторной форме амёб из вышеупомянутой группы Amoebidae. Однако, по словам автора клетки независимо от того, принимали ли они моноподиальный или полиподиальный морфотип, обычно заметно уплощались по сравнению с A. proteus, несмотря на их вытянутый субцилиндрический вид. Даже тонкие псевдоподии быстро продвигающихся амёб могут иметь толщину не более четверти ширины. Медленно движущиеся амебы иногда имели более широкую, явно сплюснутую форму, более легко определяемую, как *Thecamoeba*.

Изменения в положении вида не произошли и после работы 1978 года по ультраструктуре *T. proteoides*. Сравнивая тонкое строение покровов, митохондрий, комплекса Гольджи и внутриядерной оболочки со строением тех же структур у представителей родов *Amoeba* и *Chaos* из группы Amoebidae и у видов рода *Thecamoeba* Пэйдж приходит к выводу, что возможно рода *Amoeba* и *Thecamoeba* родственно более близки, чем это установлено в его система 1976 года. Так же, по мнению Пэйджа данные по ультраструктуре не решают вопроса о включении вида *T. proteoides* ни в один из родов.

Установить культуру *T. proteoides* не удалось, во время работы с видом автор указывает на то, что клетки содержатся в накопительной культуре, а клональную культуру получить не удается. Так же в заметках о методах ведения культуры *T. proteoides* Пэйдж указывает, что содержание клеток очень схоже с методами ведения культур *A. proteus*.

В определителе пресноводных и почвенных амеб 1988 года Пэйдж устанавливает новый род *Pseudothecamoeba* на основе вида *T. proteoides*. В этой работе упоминает об *Amoeba* *vesiculata* описанной Пенаром в 1902 году, описание которой отчасти совпадает с описанием *P. proteoides*. Он упоминает об описанной сильно вытянутой форме клетки во время локомоции, строении ядра и сильно вакуолизированной цитоплазме, как и у типового вида, однако Пенаром не упоминается ветвление клетки при движении (по Page, 1988).

Молекулярных данных по представителям рода *Pseudothecamoeba* нет*.*

## **3.3 Морфология и организация клетки представителей семейства Thecamoebidae**

### Локомоторная форма.

Локомоторная форма клетки – один из основных признаков семейства Thecamoebidae при определении амёб на светомикроскопическом уровне (Page, 1988). При локомоции форма клеток текамебид уплощенная, клетки вытянуты по направлению движения и имеют овальную, каплевидную или языковидную форму с расширенным закругленным или тупым передним краем (Рисунок 1). Эти амёбы не образуют дискретных псевдоподий и субпсевдоподий. На поверхности клетки часто видны многочисленные ругозные складки, так же некоторые представители несут на дорсальной стороне продольные гребни (для некоторых видов количество гребней является определительным признаком). На переднем конце тела образуется широкий полумесяц гиалоплазмы, края которого заходят на латеральные стороны тела и, истончаясь, продолжаются почти до заднего конца клетки. Задний конец иногда приподнят над субстратом и не несет дифференцированных уроидных структур (Page, 1969; Page, 1977; Smirnov, 1999; Michel et al., 2006; Brown et al., 2007; Dycová et al., 2010; Geisen et al., 2014). Локомоция плавная, без рывков, во время движения в цитоплазме наблюдается несколько токов гранулоплазмы, как и у всех представителей класса Discosea (Cavalier-Smith et al., 2004; Smirnov et al., 2011).

Из вышеперечисленных признаков можно сделать вывод, что представители семейства Thecamoebidae принадлежат к стриатному, ругозному и языковидному морфотипам (Smirnov and Goodkov, 1999; Smirnov and Brown, 2004).

### Флотирующая форма

При флотировании клетки представителей семейства Thecamoebidae принимают округлую форму. Вся гранулоплазма перемещается в центр клетки, а гиалоплазма занимает периферическое положение. От центральной клеточной массы в разные стороны смотрят толстые, закругленные на концах псевдоподии (приложение, Рисунок 2). Длинна псевдоподий у разных видов сильно варьирует от совсем коротких, представляющих собой небольшие выступы (*T. sphaeronucleolus*), до достаточно крупных, когда центральной клеточной массы практически нет, а вся гранулоплазма находится внутри псевдоподий (*St. sardiensis*) (Page, 1969; Page, 1977; Geisen, 2014). Флотирующая форма описана не для всех представителей семейства.

### Ядро

Ядра у представителей семейства Thecamoebidae обычно крупное и с хорошо заметными стенками для большинства представителей, что обусловлено наличием толстого слой внутриядерной ламины. Форма ядра, а так же количество и форма ядрышек в ядрах текамебид весьма разнообразны. Для представителей рода *Stenamoeba*, *Sappinia* и некоторых видов рода *Thecamoeba* (*T. quadrillineata, T. orbis, T. aesculea*)характерно наличие внутри ядра одного центрально-расположенного ядрышка и небольших, часто почти незаметных, вкраплений гранулярного материала в кариоплазме. В составе рода *Thecamoeba* встречаются виды, для которых характерны несколько близкорасположенных ядерных частей расположенных так же в центре ядра (*T. sphaeronucleolus*). Так же есть виды, для которых так же характерно большое количество ядерных кусочков, но хаотично разбросанных по всей кариоплазме (*T. terricola*). И наконец, для некоторых представителей рода *Thecamoeba* характерно строго периферическое расположение ядрышек, количество которых может сильно варьировать от двух (*T. munda*) до нескольких десятков (*T. similis*) (приложение, Рисунок 3). Строение ядра является одним из ключевых признаков при определении видов, входящих в состав семейства Thecamoebidae (Page, 1977; Page, 1988).

### Органеллы и цитоплазматические включения

На светомикроскопическом уровне в цитоплазме помимо ядра хорошо заметны многочисленные пищеварительные вакуоли. Так же обычно имеется одна большая сократительная вакуоль. После сокращения она исчезает и собирается заново путем слияния нескольких мелких вакуолей. Кристаллов в цитоплазме текамебид не обнаружено (Page, 1969; Page, 1977, Geisen et al., 2014).

На электронограммах среди органелл, прежде всего, заметны митохондрии и диктиосомы аппарата Гольджи (приложение, Рисунок 5). Митохондрии обычно округлой или овальной формы, с тубулярными или тубуло-везикулярными кристами (Seravin, 1993;Goodfellow et al., 1974; Kudryavtsev and Hausmann, 2009; Dycová et al., 2010; Geisen et al., 2014; Wylezich et al., 2015).

### Покровы клетки

О покровах клеток Thecamoebidae в литературе сказано немного, это связанно с относительно небольшим количеством работ выполненных с применением электронной микроскопии. На примере видов, по которым были сделаны работы, видно, что покровы клеток не имеют в своём составе сложных структур и представляют собой аморфный гликокаликс, часто плотный у основания и истончающийся на периферии. Толщина гликокаликса у разных видов входящих в состав семейства различается, у одних представителей толщина гликокаликса может достигать 50 нм и больше, у других представителей слой гликокаликса практически не заметен (приложение, Рисунок 4) (Page and Blackey, 1979; Kudryavtsev and Hausmann, 2009; Dycová et al., 2010; Smirnov et al., 2011; Geisen et al., 2014).

## **3.4 Экология и биоразнообразие.**

Все известные представители семейства Thecamoebidae в основном являются свободноживущими амёбами. Большинство из них, в частности некоторые амебы, включенные в состав родов *Sappinia* и *Thecamoeba* имеют сравнительно крупные размеры тела, длинна локомоторной формы часто превышает 50 мкм, иногда может доходить до 200 мкм. Относительная простота в культивировании и получении культур с большим количеством клеток отмечено для ряда видов. Виды текамёб широко распространены в пресной воде, встречаются в соленой воде и являются одними из крупнейших протистов в почве. Ранние авторы особенно ассоциировали их с почвой и мхами, где они встречаются довольно часто, однако они, по-видимому, не образуют цист, несмотря на их пребывание в местообитаниях подверженных высыханию. Представители *Thecamoeba*, вероятно, являются простыми в определении не только до рода, но и до вида (Page, 1977). Исходя из вышесказанного, виды в составе семейства Thecamoebidae представляют особый интерес и с экологической точки зрения.

Текамебиды часто упоминаются в фаунистических работах посвященных описанию пресноводных, морских и почвенных местообитаний, также замечены в экзотических местообитаниях, таких как гуано летучих мышей. В части работ попадаются неопределенные виды рода *Thecamoeba* наравне с широко распространёнными крупными и легко определяемыми амёбами видов *T. quadrilineata*, *T. similis*, *T. striata* и другие. В общей сложности в фаунистических работах упоминается 6 видов выделенных из пресноводных и наземных местообитаний и 2 морских, которые были описаны в работах Пэйджа 1971 и 1977 годов. В работах о наземных и пресноводных местообитаниях иногда упоминаются неопределенные штаммы, определить которые по работам не предоставляется возможным по причине наличия в работах лишь одной фотографии, содержащей общие черты локомоторной формы амёбы. Часто изображение неопределенного вида и вовсе не приводится.

# **4. Материал и методики**

Амёбы были изолированы из проб, собранных в следующих местообитаниях:

1. Белгородская область, заповедник «Белогорье», участок «Астрасьевы яры». Координаты: 50°33'08.5"N 36°04'47.3"E. Состав проб – степной войлок. Собрано 14 проб.
2. Белгородская область, заповедник «Белогорье», участок «Лес на Ворскле». Координаты: 50°36'56.5"N 35°57'54.2"E.Состав проб – лесная подстилка, земля, отмершие части растений. Собрано 2 пробы.
3. Карелия, Керетский архипелаг, остров Средний Горелый. Координаты: 66°17'18.1"N 33°39'38.0"E. Состав проб – лесная подстилка, отмершие части растений. Собрано 13 проб.
4. Италия, остров Искья. Координаты: 40°44'06.9"N 13°51'45.9"E. Состав проб – отмершие части растений. Собрано 13 проб.
5. Оренбургская область, берег реки Тузлукколь. Координаты: 51°14'0.42"N 56°39'18.67"E. Состав проб – отмершие части растений, почва. Собрано 5 проб.
6. Пермский край, поселок Новоильинский. Координаты: 57°54'28.40"N 55°28'58.58"E. Состав проб – отмершие части растений, почва, лесная подстилка. Собрано 11 проб.
7. Ханты-Мансийский автономный округ, Тюменская область, Кондинский район, поселок Междуреченский. Координаты: 59°34'38.59"N 65°51'13.98"E. Состав проб – отмершие части растений, кора деревьев у земли, почва, лесная подстилка. Собрано 6 проб.
8. Ханты-Мансийский автономный округ, Тюменская область, Кондинский район, лес близ реки Леушинка. Координаты: 59°39'36.26"N 65°38'46.02"E. Состав проб - отмершие части растений, кора деревьев у земли, почва, лесная подстилка. Собрано 10 проб.
9. Республика Коми, Сысольский район, село Куратово. Координаты: 60°53'30.50"N 49°45'8.92"E. Состав проб – опад, лесная подстилка. Собрано 6 проб.
10. Иркутская область, исток реки Ангара, правый берег. Координаты: 51°52'12.75"N 104°50'1.36"E. Состав пробы – отмершие части растений, сухая трава.
11. Волгоградская область, Эльтон. Координаты: 49° 6'11.23"N 46°47'21.55"E. Состав проб – сухая трава, отмершие части растений. Собрано 2 пробы.
12. Вьетнам, о-в Фукок. Координаты: 10°22'53.21"N 104° 0'17.23"E. Состав пробы – сухой опад.
13. Франция, Бреван. Координаты: 45°56'01.7"N 6°50'14.9"E. Состав пробы – сухая трава. Собрано 2 пробы.
14. Швейцария, у вершины Мон Желе. Координаты: 46°05'48.0"N 7°16'46.1"E. Состав пробы – сухая трава. Собрано 2 пробы.
15. Франция, Париж. Коородинаты: 48°51'00.9"N 2°21'03.9"E. Состав пробы – трава с грунтом.
16. Ленинградская область, Гатчинский район, деревня Чаща, берег реки Кремянка. Координаты: 59°04'58.5"N 30°27'18.1"E. Состав пробы – кора деревьев, листовой опад, мелкие ветки, сухая трава. Собрано 8 проб.
17. Италия, о-в Сардиния. Координаты: 39°23'06.9"N 9°07'07.1"E. Состав пробы – отмершие части растений, сухая трава.
18. Испания, г. Севилья. Координаты: 37°23'15.4"N 6°01'13.8"W. Состав пробы – кора деревьев, листовой опад, отмершие части растений, сухая трава. Собрано 8 проб.
19. Испания, из разных географических точек. Состав пробы – сухая трава. Собрано 6 проб.
20. Италия, Рим, Парк вилла ада. Координаты: 41°56'05.9"N 12°30'08.8"E. Состав пробы – кора платанов. Собрано 3 пробы.
21. Псковская область, у дер. Творожково. Координаты: 58°20'59.5"N 28°39'40.4"E. Состав пробы: листовой опад, кора яблонь.
22. Ленинградская область, у ж/д ст. Мшинская. Координаты: 59°00'43.8"N 29°56'20.3"E. Состав пробы - листовой опад, верхний слой почвы, мох, отмершие части растений.
23. Кисловодск. Координаты: 43°54'20.2"N 42°43'41.1"E. Состав пробы – кора берёз.
24. Абхазия, Рицинский национальный заповедник. Координаты: 43°28'51.8"N 40°32'27.1"E. Состав пробы – отмершие части растений.
25. Италия, Рим, р. Тибр. Координаты: 41°56'35.1"N 12°30'02.6"E. Состав пробы – верхний слой донного грунта.



Рисунок 1. Карта районов сбора проб. Зелеными значками отмечены места сбора проб.

Для получения накопительных культур пробы высевали и поддерживали на среде wMY (Spiegel et al., 1995): 1,5% агар, экстракт дрожжей (0,02 г на л), экстракт солода (0,02 г на л), K2HPO4\*3H2O (0,98 г на л). Культуры клонировали путем пересева одиночных клеток в новую чашку со средой и далее поддерживали при комнатной температуре в тёмном месте.

Для светомикроскопических исследований использовали микроскоп Leica DM2500 оснащенный фазово-контрастной оптикой и оптикой Номарского с камерой Leica DFC420 и инвертированный микроскоп Leica DMI3000 оснащенный фазово-контрастной оптикой. Для работы с пробами и клонирования амёб использовали бинокулярный микроскоп Leica M205C.

Для получения светомикроскопических фотографий, амёбы из культуры переносили на предметное стекло в капле жидкости идентичной составу среды: экстракт дрожжей (0,02 г на л), экстракт солода (0,02 г на л), K2HPO4\*3H2O (0,98 г на л).

Штаммы амёб были идентифицированы путем сравнения с имеющимися оригинальными описаниями и данными приведенными в работах Пэйджа (Page, 1971; Page, 1977), данными приведенными в определителях (Page, 1988; Page, 1991) и видеозаписями типовых штаммов текамебид из коллекции CCAP сделанных А.В. Смирновым в 1999-2000гг.

Геномная ДНК была выделена гуанидин-изотиоцианатным методом (Maniatis et al., 1982). Ген 18s рРНК амплифицировали с помощью праймеров RibA и RibB (Pawlowski, 2000).

ПЦР проходила при следующих условиях: начальная денатурация при 95о С 10 минут, 40 циклов (94о С 30 секунд, 50о С 60 секунд, 72о С 2 минуты 30 секунд) и финальная элонгация в течение 10 минут. Полученные ПЦР продукты очищались с помощью электрофореза в агарозном геле при 70V в течение часа, затем полученный гель красили SYBR-Green для идентификации продукта в гели и вырезли продукты из геля. Очистка производилась посредствам набора для очистки ДНК “CleanUp mini” компании Евроген. Очищенные продукты сиквенировались методом Сенджера с помощью праймеров RibA, RibB, s12.2, s12.2r, s6f (op. cit.)

Полученные последовательности были выравнены между собой и с последовательностями 18s рРНК взятыми из Генбанка при помощи программы SeaView v. 4.3.3 (Gouy et al. 2010). На основе алаймента, состоящего из последовательностей гена 18s рРНК для представителей родов *Thecamoeba, Stenamoeba, Sappinia, Acanthamoeba, Dermamoeba* и *Paradermamoeba* был проведен филогенетический анализ с помощью программы IQTree (Trifinopoulos, 2016). Построенная филогения тестировалась с помощью бутстреппинга (1000) и метода aLRT (1000) (Trifinopoulos, 2016).

# **5. Результаты**

В высевах проб из природных местообитаний на wMY агар нами были обнаружены амёбы, принадлежащие роду *Thecamoeba*. Из накопительных культур были получены клональные культуры, которые затем были документированы и определены методами световой микроскопии. В результате нами были получены 23 новые культуры. На настоящий момент наша коллекция содержит 31 штамм, содержащий амёб, которые по морфологическим признакам могут быть отнесены к роду *Thecamoeba*, в дальнейшем они будут упоминаться в работе под названием, содержащим буквенную маркировку «Та». И два штамма, амёбы которых по морфологическим признакам могут быть отнесены к роду *Sappinia*, которые будут в дальнейшем упоминаться с маркировкой «Sap». Культуры помимо интересующих нас амёб содержат другие организмы, такие как бактерии, грибы, амёбы меньших размеров. Некоторые культуры удалось очистить от эукариотических контоминантов. Для ряда культур это пока не представляется возможным в связи с тем, что эукариотические контоминанты являются пищевым объектом.

## **5.1 Описание выделенных штаммов**

Все нижеописанные штаммы проиллюстрированы фотографиями в приложении, в том же порядке, что и в работе (рисунки 6 – 25, приложение).

### Штамм Ta 34, *Thecamoeba* sp. “similis-like”

Амёбы этого штамма принадлежат к ругозному морфотипу. При локомоции по стеклу в водной среде контур их тела округло вытянутый по направлению движения, иногда до круглого. Амёба не образует дискретных псевдоподий или субпсевдоподий. Дорсальная сторона клетки несёт многочисленные ругозные складки, нередко образуя продольные гребни. На переднем конце клетки при локомоции образуется широкий полумесяц гиалоплазмы, который продолжается по латеральным сторонам почти до самого заднего конца. Дифференцированных уроидных структур задний конец не несёт.

При медленном ненаправленном движении контур клетки принимает округлые очертания. Поверхность клетки покрыта разнонаправленными складками. Слой гиалоплазмы в виде тонкого обода обрамляет клетку по периферии.

Упругие на вид покровы, хорошо заметны на светооптическом уровне при использовании контраста Номарского.

Клетки в культуре имеют одно ядро, содержащее многочисленные ядрышки неправильной округлой или вытянутой формы с изрезанным краем, расположенные по периферии ядра. Так же в ядре хорошо заметен слой внутриядерной ламины. При локомоции ядро перемещается внутри тела клетки вместе с токами цитоплазмы и может изменять свою форму при столкновении с более плотными участками цитоплазмы.

Единственная сократительная вакуоль во время движения держится в задней части клетки. После сокращения восстанавливается путём слияния мелких вакуолей. Так же в цитоплазме хорошо заметно большое количество мелких гранул и крупные, размером с ядро, пищеварительные вакуоли набитые бактериями.

В наших культурах представители данного штамма цист не образовывали.

Все описанные признаки: размерные характеристики, локомоторная форма, форма и строение ядра – схожи с описанием вида *Thecamoeba similis* Greeff, 1891, приведенным в работе Пэйджа 1977 года.

Культура была выделена из проб содержащих отмершие части растений, выделенных из пробы из Испании (пробы № 19).

### Штамм Ta 37, *Thecamoeba* sp. “similis-like”.

Амёбы штамма Ta 37 принадлежат к ругозному морфотипу. Во время локомоции на стекле амёбы вытягиваются по направлению движения. Контур клетки приобретает овальную форму. Поверхность образует многочисленные разнонаправленные ругозные складки и морщины, хорошо заметные по бокам клетки и на дорсальной стороне. Толщина гиалоплазмы на переднем конце редко превышает 1/5 длинны клетки. Амёбы не образуют дискретных псевдоподий. На переднем конце образуется широкий полумесяц гиалоплазмы, который истоньшается по краям клетки и может доходить до заднего конца. Дифференцированных уроидных структур на заднем конце не обнаружено.

При медленном ненаправленном движении очертания клетки приобретают округлую форму с неровным плавным краем. Гиалоплазма образует тонкое кольцо по периферии клетки.

Представители штамма в цитоплазме несут единственное округлое вытянутое ядро. Ядрышковый материал образует сеть на периферии ядра, под ядерной стенкой. Сеть ядрышкового материала выглядит как соединенные тонкими нитями округлые структуры с неровным краем, иногда несущие на своей поверхности лакуны. Распределение сети под поверхностью ядерной оболочки неравномерно, закономерности в расположения материала не замечено. При микроскопических исследованиях так же хорошо заметен слой внутриядерной ламины.

В цитоплазме часто присутствует одна крупная сократительная вакуоль. После сокращения вакуоль собирается заново путём слияния более мелких пузырьков.

Так же в цитоплазме хорошо заметны множественные пищеварительные вакуоли разного размера. При стрессе клетка может выбрасывать содержимое большой пищеварительной вакуоли. Так же в цитоплазме находится большое количество шарообразных гранул диаметром менее микрометра. Кристаллов в цитоплазме клеток не обнаружено.

Вышеописанные характеристики локомоторной формы и строения ядра, при прохождении фокальной плоскости посередине яра, схожи с описанием *T. similis* или *T. terricola*. Однако сложная сеть ядрышкового материала не описана ни для одного из этих видов, что позволяет сближать этот штамм с известными видами, но не определить его в состав одного из них.

Штаммы выделены с коры платанов из проб номер 20, Италия.

### Штамм Ta 43, *Thecamoeba* sp.

Амёбы из культуры Ta 43 во время движения сильно вытягиваются вдоль, таким образом, что их длина может превышать ширину в 2,5 раза. Поверхность клетки часто гладкая, также могут образовываться продольные гребни. Амёбы не образуют псевдоподий при локомоции. Вышеперечисленные признаки позволяют отнести локомоторную форму клеток штамма Та 43 к стриатному морфотипу. На перднем конце хорошо заметна широкая зона гиалоплазмы, которая может доходить до середины клетки и продолжаться дальше по бокам, доходя до заднего конца. Дискретных уроидных структур задний конец не несёт.

При ненаправленном медленном движении клетка приобретает округлые очертания, гиалоплазма равномерно распределяется по периферии клетки.

Клетки несут в цитоплазме единственно ядро с контуром округлой или овальной формы. В центре ядра хорошо видно единственное ядрышко, часто несущее неровности на поверхности. Ядрышко крупное, его диаметр обычно превышает половину ширины ядра. При изучении светооптическими методами также хорошо заметна ядерная стенка, которая может изменять свою форму при столкновении ядра с другими структурами или более плотными участками цитоплазмы.

Так же в цитоплазме присутствуют две разновидности включений включения: шарообразные гранулы и более мелкие светопреломляющие структуры неизвестного происхождения. В некоторых клетках можно обнаружить отдельные пищеварительные вакуоли с пищевыми объектами внутри. Присутствует единственная сократительная вакуоль, которая смещается к заднему концу при локомоции.

Исходя из морфологии локомоторной формы и строения ядра, амёбу не удалось определить как один из видов рода *Thecamoeba*. А отсутствие в чашках цист не позволяет отнести данный штамм к роду *Stenamoeba*.

Штамм был выделен из проб номер 16, Россия, Лен. область.

### Штамм Ta 51, *Thecamoeba* sp.

Сравнительно крупные амёбы из штамма Ta 51, при локомоции вытягиваются по направлению движения, контур обретает овальную, каплевидную или яйцевидную форму. Клетки часто образуют так называемую пирамидоподобную форму, при которой задний конец клетки приподнимается над субстратом. Контур клетки неровный, но плавный, боковые стороны принимают волнообразную форму. Поверхность несет многочисленные мелкие ругозные складки, на дорсальной стороне во время активной локомоции образуется несколько продольных гребней, начинающихся на приподнятом заднем конце и расходящиеся под небольшим углом к фронтальной зоне. Амёбы не образуют дискретных псевдоподий. Совокупность признаков позволяет отнести их к ругозному морфотипу. Расширенный передний край несет широкую зону гиалоплазмы в форме полумесяца, концы которого продолжаются на латеральные стороны клетки и доходят почти до заднего конца. На заднем конце дифференциальных уроидных структур не обнаружено.

При остановке клетка контур клетки приобретает круглые очертания с неровным плавным краем. Гиалоплазма равномерно распределяется по периферии клетки.

Часто при изготовлении препаратов клетки не сразу садятся на стекло, тогда можно увидеть разнообразные флотирующие формы. При флотировании клетка образует несколько широких выростов с тупым концом, в выросты заходит гранулоплазма. Между выростами иногда натянут тонкая мембрана, образованная покровами клетки и гиалоплазмой.

В цитоплазме находится единственное ядро с контрастными стенками. Контур ядра часто округлой формы. Стенка ядра изгибается при столкновении ядра с включениями в цитоплазме. В ядре находится одно, реже пара, ядрышко. Форма ядрышка не похоже ни на одну из описанных в литературе. Ядрышко имеет неровную шаровидную или чуть вытянутую форму. Поверхность ядрышка несет большое количество лакун, извилин и впадин, иногда зрительно подразделяющих ядрышко на несколько частей.

Кроме ядра, в цитоплазме присутствует большое количество пищеварительных вакуолей и шаровидных гранул, составляющих основу гранулоплазмы. Крупная сократительная вакуоль смещается к заднему концу и заходит в вершину клетки при локомоции.

Отношение этого штамма к одному из известных видов, а так же необычная морфология ядрышка подробно описаны в обсуждении.

Амёбы выделены из донного грунта реки Тибр, Италия; проба номер 25.

### Штамм Ta 55, *Thecamoeba similis* “similis-like”

Представители штамма Та 55 принадлежат к ругозному морфотипу – контур клетки овальный и вытянут по напрвлению движения, поверхность образует многочисленные разнонаправленные ругозные складки, на переднем конце образуется зона гиалплазмы в форме полумесяца, края которго сужаясь по бокам клетки достигают заднего конца. Амёбы не образуют псевдоподий. Дифференцированных уроидных структур задний конец не несет.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру тела клетки.

Покровы, упругие на вид, хорошо заметны на светооптическом уровне при использовании контраста Номарского.

У представителей штамма Та 55имеется одно ядро с несколькими ядрышками, расположенными по периферии. Иногда ядрышки могут нести небольшие лакуны. Так же в кариоплазме можно обнаружить расположенные хаотично скопления гранулярного материала. Ядрышковый материал может образовывать сеть по периферии ядра. Во время движения ядро перемещается внутри тела клетки вместе с токами цитоплазмы и может изменять свою форму при столкновении с более плотными участками цитоплазмы.

Единственная большая сократительная вакуоль во время движения смещается к заднему концу клетки. После сокращения вакуоль быстро восстанавливается за счет слияния нескольких более мелких вакуолей.

В цитоплазме хорошо заметны множественные пищеварительные вакуоли разного размера. Так же в цитоплазме находится большое количество шарообразных гранул диаметром менее микрометра. Кристаллов в цитоплазме клеток не обнаружено.

Штамм отнесен к виду *T. similis* по совокупности морфологических особенностей и по молекулярным данным.

Штамм выделен из проб номер 3, Россия, Керетский архипелаг, о-в. Средний.

### Штамм Ta 61, *Thecamoeba* sp.

Амёбы из штамма Ta 61 во время движения вытягиваются вдоль. Поверхность клетки покрыта складками. Амёбы не образуют псевдоподий при локомоции. Вышеперечисленные признаки позволяют отнести локомоторную форму клеток штамма Та 61 к ругозному морфотипу. На перднем конце хорошо заметна широкая зона гиалоплазмы, которая может доходить до середины клетки и продолжаться дальше по бокам, доходя до заднего конца. Дискретных уроидных структур задний конец не несёт.

При ненаправленном медленном движении клетка приобретает округлые неровные очертания, гиалоплазма равномерно распределяется по периферии клетки.

Клетки несут в цитоплазме единственно ядро с контуром округлой или овальной формы. В центре ядра хорошо видно единственное ядрышко, часто несущее неровности в виде многочисленных выпуклостей на поверхности. Ядрышко крупное, его диаметр обычно превышает половину ширины ядра. При изучении светооптическими методами также хорошо заметна ядерная стенка, которая может изменять свою форму при столкновении ядра с другими структурами или более плотными участками цитоплазмы.

Так же в цитоплазме присутствуют две разновидности включений включения: шарообразные гранулы и более мелкие светопреломляющие структуры. В некоторых клетках можно обнаружить отдельные пищеварительные вакуоли с пищевыми объектами внутри. Присутствует единственная сократительная вакуоль, которая смещается к заднему концу при локомоции.

Исходя из морфологии локомоторной формы и строения ядра, амёбу не удалось определить как один из видов рода *Thecamoeba*. Плавные очертания клеток с многочисленными складками и везикулярное строение ядра – не описаны ни для одного из видов рода *Thecamoeba*, кроме *T. aesculea*, однако представители данного штамма отличаются от *T. aesculea* сравнительно мелкими размерами клетки.

Культура получена из проб номер 16, Россия, Лен. обл.

### Штамм Ta 64, *Thecamoeba* sp.“aesculea-like”

Эти сравнительно крупные амёбы по внешнему виду и строению ядра напоминают амёб вида *T. aesculea*. Амёбы вида *Thecamoeba aesculea* принадлежат к ругозному морфотипу. При локомоции в водной среде на стекле их тело уплощено и, как правило, вытянуто по направлению движения. Амёба никогда не образует дискретных псевдоподий и субпсевдоподий во время направленного движения. На дорсальной стороне имеются многочисленные ругозные складки, так же могут образовываться продольные гребни. Гиалиновый слой цитоплазмы образует широкий полумесяц на переднем конце тела и может продолжаться на боковые стороны. Задний конец не несет дифференцированных уроидных структур.

При остановке или при ненаправленном движении клетка принимает округлую форму. Гранулоплазма смещается в центр, в то время как гиалоплазма образует тонкий слой на периферии клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

При флотировании амёба принимает шаровидную форму, с крупными и очень короткими округлыми выступами.

На светооптическом уровне с использованием контраста Номарского хорошо заметны упругие на вид покровы клетки.

В гранулоплазме хорошо заметно одно ядро везикулярного типа с контрастными стенками. Единственное центрально расположенное ядрышко имеет шарообразную форму и часто содержит несколько мелких лакун. Так же в кариоплазме можно обнаружить хаотично расположенные скопления гранулярного материала. При локомоции ядро перемещается внутри тела вместе с токами цитоплазмы и может утрачивать округлую форму при взаимодействии с плотными участками гранулоплазмы или органеллами. Форма и количество ядрышек может меняться. В постмитотический период количество ядрышек увеличено, ядрышки небольшого размера и имеют округлые очертания. При неблагоприятных условиях ядрышко утрачивает шарообразные очертания, так же в ядрышке могут появляться крупные лакуны.

Единственная большая сократительная вакуоль при локомоции лежит на заднем конце тела. Часто вокруг сократительной вакуоли можно заметить большое количество мелких вакуолей, которые постепенно сливаются с ней.

В гранулоплазме присутствуют многочисленные пищеварительные вакуоли, заключающие внутри себя пищевые объекты (в нашем случае бактерии и конидии грибов).

В наших культурах *T. aesculea* цист обнаружено не было.

По совокупности признаков: размерные характеристики, локомоторная форма, форма и строение ядра -мы определили представителей этого штамма, как амеб принадлежащих к роду *Thecamoeba*, виду *Thecamoeba aesculea* Kudryavtsev and Hausmann, 2009.

Амёбы выделены из проб номер 21, Россия, Псковская обл.

### Штамм Ta 65, *Thecamoeba* sp.“similis-like”

Клетки при движении имеют округлый или вытянутый контур. Поверхность покрыта многочисленными ругозными складками. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая часто продолжается на боковые стороны клетки, формируя так называемый «антеро-латеральный серп гиалоплазмы» (Page, 1977). Задний конец тела не несет дифференцированных уроидных структур.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

У представителей данного штамма ядро содержит небольшое количество ядрышкого материала в виде небольших шаровидных структур расположенных на периферии ядра. Так же хорошо заметна толстая ядерная стенка, меняющая свою форму при столкновении с другими включениями в цитоплазме.

Цитоплазма так же несет большое количество разнообразных включений, пищеварительных вакуолей и единственную большую сократительную вакуоль, которая во время движения смещается к заднему концу клетки. Особенно интересны многочисленные правильные шаровидные влючения с ореолом прозрачной цитоплазмы вокруг. Диаметр таких включений около полумикрометра.

Из-за наличия в ядре периферически расположенных участков ядрышкого материала, хоть и немногочисленного, этот штам был отнесён в группу “similis-like”.

Штамм выделен из местообитания номер 21, Россия, Псковская обл.

### Штамм Ta 66, *Thecamoeba* sp.“similis-like”

Представители штамма Та 66 принадлежат к ругозному морфотипу. При локомоции в водной среде на стекле их тело уплощено и, как правило, вытянуто по направлению движения. Амёбы не образуют дискретных псевдоподий и субпсевдоподий во время движения. Поверхность несёт многочисленные разнонаправленные ругозные складки, на переднем конце образуется зона гиалплазмы в форме полумесяца, края которго сужаясь по бокам клетки достигают заднего конца. Дифференцированных уроидных структур клетка не образует.

При остановке или при ненаправленном движении клетка принимает округлую форму. Гранулоплазма смещается в центр, в то время как гиалоплазма образует тонкий слой на периферии клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

Ядро шаровидной формы или в форме чуть вытянутого шара. Под хорошо заметной ядерной стенкой располагаются многочисленные гранулы ядрышкового материала неправильной формы. При прекращении движения хорошо заметно, что ядро постоянно вращается вокруг своей оси.

Кроме ядра, в цитоплазме присутствует большое количество пищеварительных вакуолей и шаровидных гранул, составляющих основу гранулоплазмы. Крупная сократительная вакуоль смещается к заднему концу клетки при локомоции.

Наличие в ядре многочисленных периферически расположенных участков ядрышкого материала, этот штам был отнесён в группу “similis-like”.

Штамм выделен из проб номер 16, Россия, Лен. область.

### Штамм Ta 68, *Thecamoeba* n. sp.1“similis-like”

Клетки при движении имеют округлый или вытянутый контур. Поверхность покрыта многочисленными ругозными складками. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая часто продолжается на боковые стороны клетки, продалжаясь почти до заднего конца. Задний конец тела не несет дифференцированных уроидных структур.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

У представителей данного штамма ядро содержит ядрышковый материала в виде шаровидных структур расположенных на периферии ядра. Так же хорошо заметна толстая ядерная стенка, меняющая свою форму при столкновении с другими включениями в цитоплазме.

Кроме ядра цитоплазма содержит большое количество вакуолей, с небольшим количеством содержимого, которые занимают практически весь объем гранулоплазмы. Также там находятся более крупные пищеварительные вакуоли заполненные бактериями.

Вышеописанные характеристики локомоторной формы и строения ядра, схожи с описанием *T. similis*. Однако молекулярные данные и филогенетический анализ указывают на то, что это новый для науки вид.

Штамм выделен из проб номер 16, Россия, Лен. область.

### Штамм Ta 69, *Thecamoeba* sp.“similis-like”

Представители штамма Та 69 принадлежат к ругозному морфотипу – контур клетки овальный и вытянут по напрвлению движения, поверхность образует многочисленные разнонаправленные ругозные складки, на переднем конце образуется зона гиалплазмы в форме полумесяца, края которго сужаясь по бокам клетки достигают заднего конца. Амёбы не образуют псевдоподий. Дифференцированных уроидных структур задний конец не несет.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру тела клетки.

Покровы, упругие на вид, хорошо заметны на светооптическом уровне при использовании контраста Номарского.

У представителей этого штаммаимеется одно ядро с большим количеством ядрышек, которые расположены по периферии. Иногда ядрышки могут нести небольшие лакуны. Так же в кариоплазме можно обнаружить расположенные хаотично скопления гранулярного материала. Во время движения ядро перемещается внутри тела клетки вместе с токами цитоплазмы и может изменять свою форму при столкновении с более плотными участками цитоплазмы.

Единственная большая сократительная вакуоль во время движения смещается к заднему концу клетки. После сокращения вакуоль быстро восстанавливается за счет слияния нескольких более мелких вакуолей.

В цитоплазме хорошо заметны множественные пищеварительные вакуоли разного размера. Так же в цитоплазме находится большое количество мелких шарообразных гранул. Кристаллов в цитоплазме клеток не обнаружено.

Периферическое расположение отдельных частей ядрышкового материала позволяет сближать этот штамм с представителями вида *T. similis*.

Штамм выделен из проб номер 16, Россия, Лен. область.

### Штамм Ta 70, *Thecamoeba* sp.“similis-like”

Клетки при движении имеют округлый или вытянутый контур. Поверхность покрыта многочисленными ругозными складками. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая часто продолжается на боковые стороны клетки, формируя так «антеро-латеральный серп гиалоплазмы» (Page, 1977). Задний конец тела не несет дифференцированных уроидных структур.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

У представителей данного штамма ядро содержит большое количество ядрышкого материала в виде небольших структур неправильной формы расположенных на периферии ядра. Так же хорошо заметна толстая ядерная стенка, меняющая свою форму при столкновении с другими включениями в цитоплазме.

Цитоплазма так же несет большое количество разнообразных включений, пищеварительных вакуолей и единственную большую сократительную вакуоль, которая во время движения смещается к заднему концу клетки.

Из-за наличия в ядре периферически расположенных участков ядрышкого материала, этот штам был отнесён в группу “similis-like”.

Штамм выделен из проб номер 21, Россия, Псковская обл.

### Штамм Ta 72, *Thecamoeba* n. sp.1“similis-like”

Представители этого штамма по молекулярным и морфологическим данным идентичны амёбам штамма Та 68. Клетки при движении имеют округлый или вытянутый контур. Поверхность покрыта многочисленными ругозными складками. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая часто продолжается на боковые стороны клетки, продалжаясь почти до заднего конца. Задний конец тела не несет дифференцированных уроидных структур.

При остановке или при ненаправленном медленном движении клетка принимает округлую форму. Слой гиалоплазмы становится тонким и равномерным и занимает всю периферию клетки. Ядро и сократительная вакуоль смещаются к центру клетки.

У представителей данного штамма ядро содержит ядрышковый материала в виде шаровидных структур расположенных на периферии ядра. Так же хорошо заметна толстая ядерная стенка, меняющая свою форму при столкновении с другими включениями в цитоплазме.

Кроме ядра цитоплазма содержит большое количество вакуолей, с небольшим количеством содержимого, которые занимают практически весь объем гранулоплазмы. Также там находятся более крупные пищеварительные вакуоли заполненные бактериями.

Вышеописанные характеристики локомоторной формы и строения ядра, схожи с описанием *T. similis*. Однако молекулярные данные и филогенетический анализ указывают на то, что это новый для науки вид.

Штамм выделен из проб номер 22, Россия Лен. область.

### Штамм Ta 73, *Thecamoeba* sp.

Некрупные амёбы этого штамма во время движения вытягиваются вдоль. Поверхность клетки часто гладкая, также могут образовываться продольные гребни. Амёбы не образуют псевдоподий при локомоции. Вышеперечисленные признаки позволяют отнести локомоторную форму клеток штамма Та 73 к стриатному морфотипу. На перднем конце хорошо заметна широкая зона гиалоплазмы, которая может доходить до середины клетки и продолжаться дальше по бокам, доходя до заднего конца. Дискретных уроидных структур задний конец не несёт.

При ненаправленном медленном движении клетка приобретает округлые очертания, гиалоплазма равномерно распределяется по периферии клетки.

Представители штамма Ta 15 имеют одно ядро везикулярного типа. Ядро может иметь звездообразную форму с плавными очертаниями. На светомикроскопическом уровне хорошо заметны стенки ядра. Ядрышко всегда располагается в центре ядра, вытянуто-овальной или бобовидной формы; ядрышко может нести несколько небольших лакун. Во время движения ядро перемещается вместе с потоками гранулоплазмы и может изменять свою форму при соприкосновении с другими внутриклеточными структурами.

Так же в цитоплазме присутствуют две разновидности включений включения: шарообразные гранулы и более мелкие светопреломляющие структуры. В некоторых клетках можно обнаружить отдельные пищеварительные вакуоли с пищевыми объектами внутри. Присутствует единственная сократительная вакуоль, которая смещается к заднему концу при локомоции.

Форма ядрышка не указывает на родство с каким-либо известным видом, однако очень похоже по форме на ядрышко штамма Та 15, описанного в прошлой нашей работе.

Данный штамм выделен из местообитания номер 22, Россия Лен. область.

### Штамм Ta 74, *Thecamoeba* sp.

Амёбы данного штамма относятся к ругозному морфотипу и в целом повторяют описание штамма 73, за исключением описания строения ядрышка, которое описано в обсуждении.

### Штамм Ta 75, *Thecamoeba* n. sp.2 “quadrilineata-like”

Амёбы этого штамма схожи по морфологии с представителями вида *T. quadrilineata*. Представители этого вида принадлежат к амёбам стриатного морфотипа. В водной среде на стекле локомоторная форма *T. quadrilineata* обычно уплощенная, вытянутая по направлению движения. Во время направленного перемещения клетка никогда не образует дискретных псевдоподий или субпсевдоподий. На дорсальной стороне тела при передвижении часто имеются четыре продольных гребня, но у крупных экземпляров количество гребней может увеличиваться. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая составляет до половины общей площади тела амёбы и часто продолжается на боковые стороны клетки, формируя так называемый «антеро-латеральный серп гиалоплазмы» (Page, 1977). Задний конец тела клетки часто приподнят над субстратом и не несет дифференцированных уроидных структур.

Ненаправленно движущиеся или неперемещающиеся клетки распластываются по субстрату и принимают округлую форму. При флотировании клетки образуют крупные, конусовидные округлые на конце псевдоподии, которые плавно переходят одна в другую.

На светомикроскопическом уровне с использованием контраста Номарского хорошо заметны плотные покровы амёбы.

В гранулоплазме присутствует одно везикулярное ядро с контрастными стенками, так же хорошо заметными при использовании оптики Номарского. Ядрышко округлое, центрально расположенное, может иметь несколько лакун. Кроме того в кариоплазме можно обнаружить хаотично расположенные скопления гранулярного материала. Во время движения ядро движется вместе с токами цитоплазмы и при перемещении может не иметь правильной шаровидной формы. Размеры, форма и количество ядрышек могут меняться. При неблагоприятных условиях (в нашем случае это придавливание предметным стеклом и тепло от лампы микроскопа) ядрышко утрачивает шаровидную форму, так же внутри ядрышка могут образовываться крупные лакуны. Нами не был полностью прослежен процесс митотического деления, но на задокументированных стадиях митоза в ядре присутствовали несколько шарообразных или сильно вытянутых ядрышек разных размеров, так же встречались ядрышки неправильной формы с плавными округлыми очертаниями.

При движении на заднем конце тела находится одна большая сократительная вакуоль; после сокращения она быстро восстанавливается из нескольких сливающихся воедино вакуолей меньших размеров. Рядом может находиться одна крупная вакуоль, заполненная бактериями. При неблагоприятных условиях амёба выбрасывает во внешнюю среду содержимое этой вакуоли. Так же в гранулоплазме присутствуют многочисленные пищеварительные вакуоли, которые содержат пищевой объект (в нашем случае палочковидные бактерии).

В наших культурах амёбы этого вида цист не образовывали.

Однако по морфологическим данным этот штамм относится к родственному *T. quadrilineata* новому для науки виду.

### Штамм Ta 77, *Thecamoeba* sp. “striata-like”

При остановке амебы выпуклые и мало или совсем не морщинистые; В локомоции уплощенные, продолговатые или удлиненно-эллиптические по контуру, с обычно закругленным задним концом; Дорсальная поверхность образует несколько параллельных дорзальных складок, простирающихся далеко вперед; Гиалоплазма образует передне-латеральный полумесяц, иногда простирающийся на три четверти длины назад.

По строению ядра и морфологии локомоторной форы напоминают *T. striata* описанных Пэйджем в работе 1971 года.

Штамм выделен из проб номер 16, Россия, Лен. область.

### Штамм Ta 78, *Thecamoeba* sp.“aesculea-like”

Морфология локомоторной формы и строения ядра повторяет признаки штамма Та 64. Данный штамм выделен из проб номер 23, Россия, Кисловодск.

### Штамм Ta 79, *Thecamoeba* sp. “striata-like”

Данный вид также повоторяет описание *T. striata* в работе Пэйджа 1971 года.

Штамм выделен из проб номер 23, Кисловодск.

### Штамм Ta 81, *Thecamoeba* sp.

Представители этого вида принадлежат к амёбам стриатного морфотипа. В водной среде на стекле локомоторная форма представителей штаммаобычно уплощенная, вытянутая по направлению движения. Во время направленного перемещения клетка никогда не образует дискретных псевдоподий или субпсевдоподий. На дорсальной стороне тела при передвижении часто имеются четыре продольных гребня, но у крупных экземпляров количество гребней может увеличиваться. В передней части тела имеется обширная зона гиалоплазмы, которая составляет до половины общей площади тела амёбы и часто продолжается на боковые стороны клетки, формируя так называемый «антеро-латеральный серп гиалоплазмы» (Page, 1977). Задний конец тела клетки часто приподнят над субстратом и не несет дифференцированных уроидных структур.

Ненаправленно движущиеся или неперемещающиеся клетки распластываются по субстрату и принимают округлую форму. При флотировании клетки образуют крупные, конусовидные округлые на конце псевдоподии, которые плавно переходят одна в другую.

На светомикроскопическом уровне с использованием контраста Номарского хорошо заметны плотные покровы амёбы.

В гранулоплазме присутствует одно везикулярное ядро с контрастными стенками, так же хорошо заметными при использовании оптики Номарского. Ядрышко округлое, центрально расположенное, может иметь несколько лакун. Кроме того в кариоплазме можно обнаружить хаотично расположенные скопления гранулярного материала. Во время движения ядро движется вместе с токами цитоплазмы и при перемещении может не иметь правильной шаровидной формы. Размеры, форма и количество ядрышек могут меняться. При неблагоприятных условиях (в нашем случае это придавливание предметным стеклом 18

и тепло от лампы микроскопа) ядрышко утрачивает шаровидную форму, так же внутри ядрышка могут образовываться крупные лакуны. Нами не был полностью прослежен процесс митотического деления, но на задокументированных стадиях митоза в ядре присутствовали несколько шарообразных или сильно вытянутых ядрышек разных размеров, так же встречались ядрышки неправильной формы с плавными округлыми очертаниями.

При движении на заднем конце тела находится одна большая сократительная вакуоль; после сокращения она быстро восстанавливается из нескольких сливающихся воедино вакуолей меньших размеров. Рядом может находиться одна крупная вакуоль, заполненная бактериями. При неблагоприятных условиях амёба выбрасывает во внешнюю среду содержимое этой вакуоли. Так же в гранулоплазме присутствуют многочисленные пищеварительные вакуоли, которые содержат пищевой объект (в нашем случае палочковидные бактерии).

По совокупности признаков: размерные характеристики, локомоторная форма, форма и строение ядра мы определили представителей этого штамма, как представителей рода *Thecamoeba*, вида *Thecamoeba quadrilineata* Carter, 1856, однако в культуре присутствуют клетки с необычным строением ядрышка, описание которого приводится в обсуждении.

Штамм выделен из проб номер 24, Абхазия.

## **5.2 Молекулярные данные**

Для дальнейшего определения амёб, используя методы ПЦР и секвенирования по Сенджеру, были получены последовательности гена 18s рРНК для штаммов Ta 2, Ta 10, Ta 24, Ta 55, Ta 56, Ta 68, Ta 71, Ta 72, Ta 75, Sap 1, Sap 3. В результате сравнения полученных последовательностей, используя также последовательности из Генбанка выяснилось, что культуры Ta 2, Ta 10 и Ta 24 являются штаммами вида *Thecamoeba* *quadrilineata*. Штаммы Ta 55 и Ta 56 принадлежат виду *Thecamoeba* *similis*, эти штаммы были получены из одной пробы, поэтому будут рассматриваться вместе; культуры Sap 1 и Sap 3 содержат амёб вида *Sappinia* *diploidea*; Ta 71 и Ta 72 по молекулярным данным являются новым для науки видом, эти культуры относятся к одному виду и получены из одной пробы, поэтому так же будут рассматриваться вместе, Ta 68 и Ta 75 по молекулярным данным являются представителями нового для науки вида, однако выделены из разных местообитаний и являются интересным объектом для изучения биогеографии.

Используя полученные нами последовательности гена 18s рРНК и последовательности гена 18s рРНК из Генбанка для видов рода *Thecamoeba*, *Sappinia*, *Stenamoeba*, а также *Acanthamoeba*, *Dermamoeba* и *Paradermamoeba* в качестве внешних групп, нами было построено филогенетическое дерево (рисунок 26, приложение). На полученном дереве все представители семейства Thecamoebidae группируются, образуя монофилетическую ветвь, которая и является отражением семейства. В рамках семейства все три рода так же образуют филогенетически единые группы с высокими поддержками. Самой базальной в семействе является ветвь, соответствующая роду *Stenamoeba*. Внутри рода *Thecamoeba* выявлены две ветви с высокими показателями поддержки, в одну из которых попадают виды *T. quadrilineata*, *T. aesculea*, а также штамм Ta 75. В другую ветвь внутри рода попадают вид *T. similis* и штаммы Ta 68 и Ta 71. Все более мелкие подгруппы и виды внутри рода *Thecamoeba* так же обладают высокими поддержками.

# **6. Обсуждение**

Все наши культуры по морфологическим признакам можно разделить на следующие условные группы:

1. “quadrilineata-like” – некрупные амебы стриатного морфотипа с единственным ядром, содержащим единственное центрально расположенное ядрышко. Группа включает штаммы Ta 2, Ta 10, Ta 24, описанные в нашей предыдущей работе, и новый штамм Ta 75. Амёбы из этих культур схожи по описанию с описанием вида *T. quadrilineata* в работе Пэйджа 1977 года.
2. “aesculea-like” – крупные амебы, в большей степени проявляющие черты ругозного морфотипа, с единственным ядром, содержащим единственное центрально расположенное ядрышко. Группа включает штамм Ta 4, описанный в нашей предыдущей работе, и новые штаммы Ta 64 и Ta 78. Амёбы из этих культур схожи по описанию с описанием вида *T. aesculea* в работе Пэйджа 1977 года.
3. “similis-like” – некрупные амёбы ругозного морфотипа, имеющие единственное шарообразное или чуть вытянутое ядро, содержащие множество ядрышек расположенных по периферии ядра. Группа включает штамм Ta 16, описанный в нашей предыдущей работе, и новые культуры Ta 34, Ta37, Ta 55, Ta 56, Ta 65, Ta 66, Ta 68, Ta 69, Ta 70, Ta 71 и Ta72.
4. “striata-like” – амёбы обычно стриатного морфотипа с единственным ядром, содержащим несколько крупных плоских ядрышек, которые располагаются по периферии ядра. Группа включает штаммы Ta 77 и Ta 79.
5. “sappinia” – амебы языковидного или ругозного морфотипа с двумя близкорасположенными ядрами, каждое из которых содержит одно центрально расположенное сферическое ядрышко. В группу входят штаммы Sap 1 и Sap 3.
6. Шестая группа включает в себя штаммы, каждый из которых мы не смогли отнести ни к одному из известных видов. Эта группа содержит 6 штаммов, каждый из которых интересен как гипотетически новый для науки вид рода *Thecamoeba*. Это штаммы Ta 15, описанный в нашей прошлой работе, Ta 43, Ta 51, единственный в нашей культуре штамм, выделенный из проб речного грунта, Та 61, Ta 73, Ta 74 и Ta 81.

Штамм Ta 15, отличается от описанных в литературе видов текамеб морфологией ядра. Представители штамма Ta 15 имеют одно ядро везикулярного типа. Ядро может иметь звездообразную форму с плавными очертаниями. На светомикроскопическом уровне хорошо заметны стенки ядра. Среди представителей этого штамма замечен полиморфизм ядрышек: ядрышко всегда располагается в центре ядра, но форма его не постоянна и может варьироваться от вытянуто-овальной и бобовидной до круглой, так же встречаются клетки с ядрышком грушевидной и веретеновидной формы; ядрышко может нести несколько небольших лакун. Во время движения ядро перемещается вместе с потоками гранулоплазмы и может изменять свою форму при соприкосновении с другими внутриклеточными структурами». Возможно, ядро имеет постоянную бобовидную форму, но из-за постоянного вращения ядрышко видно под разными ракурсами, что и дает иллюзию полиморфизма ядрышка. Такое строение ядрышка неизвестно для описанных в литературе видов, поэтому штамм Ta 15 является новым для науки видом.

Штаммы Ta 43 и Ta 73 по морфологическим признакам похожи на вид *T. quadrilineata*, однако они не были нами включены в группу “quadrilineata-like” в связи с их малыми размерами и морфологией ядра. Единственное центрально расположенное шаровидное ядрышко у представителей этого штамма часто имеет неровности на поверхности, которые не похожи на встречающиеся у *T. quadrilineata* лакуны. Так же были замечены амёбы с ядрышками неправильной формы. В остальном клетки обоих штаммов при локомоции имеют черты стриатного морфотипа, характерного для *T. quadrilineata*, с образованием на дорсальной поверхности от одного до трёх продольных гребней во время движения*.* Совокупность морфологических и размерных характеристик дает право полагать, что амёбы штаммов Ta 43 и Ta 73 относятся к новому для науки виду.

Отличительной особенностью амёб штамма Ta 51 также является необычная морфология ядрышка. Единственное ядрышко по своей форме в общих чертах шаровидное, однако, иногда попадаются отдельные клетки, несущие в ядре пару ядрышек, что возможно связанно с определенными стадиями клеточного цикла. Но основной отличительной чертой является большое количество лакун и впадин на поверхности ядрышка, что не было описано не для одного из известных видов текамёб. При попытках получить последовательность гена 18s рРНК нами были получены фрагменты последовательности, которые в результате сравнения с базой Генбанка сильно похожи на последовательность интересующего нас гена, но представителей группы Dermocystida Cavalier-Smith, 1998(Opisthokonta: Mesomycetozoea), кожных паразитов рыб и земноводных. Однако в культуре кроме амёб других эукариот обнаружено не было, в связи, с чем мы предполагаем, что данные организмы находятся внутри клеток штамма Ta 51. Пока определение места локализации симбионта мы не можем внести в диагноз штамма текамеб раздел о ядре, так как одной из мест локализации симбионта может быть ядро и форма ядрышка может быть изменена в связи с присутствием симбионта. Так же не определившись с морфологией ядра мы не можем отнести представителей этого штамма к одному из известных видов. Однако это также не дает нам права на описание нового вида.

У ряда клеток из штамма Ta 74 ядрышко имеет неправильную форму. Ядрышко широкое вытянутое от одной стенки ядра до другой. Другие клетки данного штамма имеют везикулярное ядро напоминающие по строению ядро *T. quadrilineata*. Во время передвижения клетки приобретают черты стриатного морфотипа, однако из-за наличия необычных ядрышек этот штамм не был помещен в группу “quadrilineata-like”, и рассматривается как новый для науки вид.

Штамм 81 также как и штамм Ta 74 содержит клетки с разным строением ядрышка. У штамма Ta 81, в отличие от Ta 74 вытянутые ядрышки гораздо уже и для описания их формы больше подходит слово веретенообразные. По признакам локомоторной формы представителей этого штамма можно отнести к стриатному морфотипу. Часть клеток содержит неровное ядро неправильной формы с неправильными очертаниями и гибкой стенкой, которая изменяет очертания при перемещении ядра вместе с токами цитоплазмы. Ядро содержит одно центрально расположенное ядрышко с округлым контуром и неровным краем. Возможно, что наличие округлых ядрышек это проекция на веретеновидное ядрышко с узкой стороны. Описаний подобного строения ядрышка в литературе не встречается, что позволяет полагать, что амёбы штамма 81 являются представителями нового для науки вида.

Первые четыре группы отражают предполагаемое нами видовое разнообразие нашей коллекции. Как видно из описания групп основными признаками для их формирования были морфотип локомоторной формы и строение ядра. Именно на эти признаки в основном опирался Пэйдж в своих работах 1971 и 1977 годов по подробному описанию всего известного на тот момент видового разнообразия *Thecamoeba*. В этих работах он развил идею Бови и Яна по разделению рода *Thecamoeba* на подгруппы, сделав это менее масштабно и не разнося представителей рода в разные подотряды, специально созданные для этого. Однако, так же как и в системе Бови и Яна основным, по его мнению, признаком для разделения рода является общий вид локомоторной формы. Он делит род на «verrucosa-like» и «striata-like». В первую группу попадают амёбы, которые по современной системе имеют ругозный морфотип, а во вторую – стриатный. Такое распределение вполне логично, если основываться только на морфологических данных, оставляя такой признак как строение ядра вторичным. Однако на построенном нами филогенетическом дереве можно увидеть несколько иную ситуацию. На дереве внутри хорошо очерченного рода *Thecamoeba* можно заметить две ветви с высокими поддержками, что говорит о четком разделении между этими группами внутри рода (рисунок 27, приложение). Стоит отметить, что в одну из ветвей попадают такие виды как *T. quadrilineata* и *T. aesculea*, а так же штаммы Ta 2, Ta 10, Ta 24 и Ta 75, отнесенные нами в группу “quadrilineata-like”, то есть по морфологическим признакам их можно определить как *T. quadrilineata.* Во второй ветви на филогенетическом дереве располагаются вид *T. similis* и штаммы Ta 55, Ta 68 и Ta 71, отнесенные нами в группу “similis-like”, то есть по морфологическим признакам их можно определить как *T. similis.*

Подобные результаты почти не противоречат системе Пэйджа: в первой ветви находятся виды стриатного морфотипа «striata-like», а во второй ругозного «verrucosa-like». Стоит однако отметить, что для *T. aesculea* при локомоции больше характерны черты ругозного морфотипа, а не стриатного. Учитывая это можно считать, что группа «verrucosa-like» является парафилитической, и из которой происходит группа «striata-like». Подтверждение этой теории требует дальнейшей проверки, включающей в себя получение последовательности гена 18s рРНК представителей вида *T. striata,* которые есть в нашей коллекции, а также поиск новых видов имеющих стриатный морфотип.

По полученным результатам мы можем предложить альтернативную модель разделения рода *Thecamoeba,* используя в качестве основного морфологического признака морфологию ядра. Тогда следуя нашей модель и используя наши результаты род *Thecamoeba* можно поделить на монофилетические подгруппы. Все представители первой ветви обладают схожей морфологией ядра. Эта ветвь включает в себя виды, обладающие единственным центральным ядрышком, куда попали представители видов *T. quadrilineata* и *T. aesculea*, а так же штаммы Ta 2, Ta 10, Ta 24 и Ta 75. Представителями второй группы являются амёбы, имеющие большое количество ядрышек, расположенных по периферии ядра. Все известные нам представители рода *Thecamoeba*, последовательности гена 18s рРНК которых есть в свободном доступе и получены нами, формируют вторую ветвь на филогенетическом дереве. Туда входят вид *T. similis*, а так же штаммы Ta 55, Ta 68 и Ta 71, которые были помщены в морфологическую группу “similis-like”.

Как упоминалось ранее, в литературе посвященнй описаниям фауны пресноводных и наземных местообитаний можно встретить упоминания о 8 видах рода *Thecamoeba*, описанных Пэйджем в работах 1971 и 1977 годов и включенных им в определители. В процессе работы нам не удалось собрать полную коллекцию, описанную Пэйджем. Однако наша коллекция уже содержит 9 морфологически различных штаммов, 5 из которых отличаются от описанных Пэйджем текамёб и, скорее всего, являются новыми для науки видами. Так же нами было выделено 2 новых вида, которые схожи по морфологии с уже известными видами *T. quadrilineata* и *T. aesculea*. Такие результаты показывают, что разнообразие центрального рода семейства Thecamoebidae – рода *Thecamoeba* - остается существенно неизученным. Обнаружение нами двух новых видов слабо отличающихся морфологически от уже известных, но имеющих собственные уникальные молекулярные подписи указывает на возможное скрытое биоразнообразие рода *Thecamoeba*. Наличие подобных видов, схожих морфологически, но имеющих уникальные молекулярные подписи в сиквенсах различных генов может быть толчком для пересмотра системы рода *Thecamoeba*. В конечном итоге при многочисленных открытиях новых скрытых видов, все известные на данный момент виды могут быть переведены в ранг морфологических групп в рамках рода *Thecamoeba*, основанные на строении морфологии ядра и морфотипа локомоторной формы.

## **Основные полученные результаты:**

* Выделено 33 штамма представителей семейства Thecamoebidae, 10 из них по морфологическим данным являются новыми для науки видами.
* Получены образцы геномной ДНК для 13 штаммов.
* Получены последовательности гена 18s рРНК для 11 видов.
* По молекулярным данным обнаружены два новых для науки вида.
* Но основе последовательностей гена 18s рРНК построено и проанализировано филогенетическое дерево семейства Thecamoebidae; обнаружены две крупные ветви в составе семейства.

# **7. Выводы**

* Выделение нами многочисленных штаммов амёб, входящих в состав семейства Thecamoebidae, из наземных местообитаний и обнаружение нескольких новых видов показывает, что разнообразие семейства остается существенно недоисследованным. Одним из очагов биоразнообразия амёб рода *Thecamoeba* являются почва, опад, растительный лом и кора деревьев.
* Семейство Thecamoebidae и входящие в его состав роды *Thecamoeba*, *Sappinia* и *Stenamoeba* являются монофилетическими таксонами. Среди представителей рода *Thecamoeba* существуют виды, схожие по морфологии локомоторной формы и ядра, но хорошо различимые по молекулярным данным.
* Род *Thecamoeba* имеет две хорошо различимые молекулярно и морфологически ветви амёб с различным строением ядрышка.
* Морфологическое сходство выделенных штаммов с известными видами, но их очевидное различие по молекулярным данным показывает, что некоторые морфологические виды рода *Thecamoeba* представляют собой группы «скрытых» видов.

# **8. Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю – А. В. Смирнову за неоценимую помощь в написании данной работы и своевременную поддержку в трудных ситуациях.

Так же автор выражает благодарность сотрудникам и студентам кафедры зоологии беспозвоночных оказавших большую помощь в освоении инструментальных методов и методов работы с живыми культурами протистов. В ходе выполнения работы было использовано оборудование ресурсных центров «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Культивирование микроорганизмов».

Особая благодарность за помощь в сборе материала выражается Кудрявцеву Александру Александровичу, Хафизовой Галине Васильевне, Бондаренко Наталье Ивановне, Володькиной Валерии Александровне, Насоновой Елене Станиславовне, Вотиновой Валентине Александровне, Камышацкой Оксане Геннадьевне и Карпову Сергею Алексеевичу.

# **9. Список литературы**

1. Adl S.M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists // J. Eukaryot. Microbiol. 2005. Vol. 52, № 5. P. 399–451.
2. Averintzev S. Freshwater rhizopods // Proc St Petersbg. Imp Nat Soc. 1906. Vol. 36. P. 120– 336.
3. Bovee E.C. The lobose amoebas IV. A key to the order Granulopodida Bovee & Jahn, 1966, and descriptions of some new and little-known species in this order. // Arch Protistenkd. 1972. Vol. 114. P. 371–403.
4. Bovee E.C. The lobose amebas. I. A key to the suborder Conopodina Bovee and Jahn, 1966 and descriptions of thirteen new and little known Mayorella species. // Arch Protistenkd. 1970. Vol. 114. P. 371–403.
5. Bovee E.C. An emendation of the ameba genus Flabellula and a description of Vannella gen. nov. // Trans. Amer. Micros. Soc. 1965. Vol. 84, № 2. P. 217–227.
6. Bovee E.C. Morphological identification of free-living Amoebida. // Proc Iowa Acad Sci. 1954. Vol. 60. P. 599–615.
7. Bovee E.C., Jahn T.L. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. III. Orders, suborders, families, and subfamilies in the superorder Lobida. // Syst. Zool. 1966. Vol. 15. P. 229–240.
8. Bovee E.C., Jahn T.L. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. II. The organisation of subclasses and orders in relationship to the classes Autotractea and Hydraulea. // Am Midl Nat. 1965. Vol. 73. P. 293–298.
9. Bovee E.C., Jahn T.L. Locomotion and the classification of Amoebida and Testacida. // J Protozool. 1960. Vol. 7(suppl). P. 8.
10. Brown M.W., Spiegel F.W., Silberman J.D. Amoeba at attention: Phylogenetic affinity of *Sappinia* pedata // J. Eukaryot. Microbiol. 2007. Vol. 54, № 6. P. 511–519.
11. Carter H.G. Notes on the freshwater infusoria on the island of Bombay. No. 1. Organisation. // Ann. Mag. nat. Hist. 1856. Vol. 2nd ser., № 18. P. 115–132, 221–249 and plates 5–7.
12. Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life // Proc. R. Soc. L. 2004. Vol. 271. P. 1251–1262.
13. Chatton E. Ordre des Amoebiens nus ou Amoebaea. // Grassé P Trait. Zool. Masson Paris. 1953. Vol. 1, № 2. P. 5–91.
14. Dangeard P.A. Contribution à l’étude des Acrasiées // Botaniste. 1896. Vol. 5. P. 1–20.
15. Dyková I. et al. Living together: The marine amoeba *Thecamoeba* hilla Schaeffer, 1926 and its endosymbiont Labyrinthula sp. // Eur. J. Protistol. 2008. Vol. 44, № 4. P. 308–316.
16. Fromentel E. Etudes sur les Microzoaires ou Infusoires Proprement Dits // Etudes sur les Microzoaires ou Infusoires Proprement Dits. 1874.
17. Geisen S. et al. Two new species of the genus *Stenamoeba* (Discosea, Longamoebia): Cytoplasmic MTOC is present in one more amoebae lineage // Eur. J. Protistol. Elsevier GmbH, 2014. Vol. 50, № 2. P. 153–165.
18. Goodfellow L.P., Belcher J.H., Page F.C. A light and electron-microscopical study of *Sappinia diploidea*, a sexual amoeba // Protistologica. 1974. Vol. 2. P. 207–216.
19. Hall R.P. Protozoology. Prentice-Hall, New York. 1953.
20. Jahn T.L., Bovee E.C. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. I. As a basis for a new major dichotomy into two classes, Autotractea and Hydraulea // Am Midl Nat. 1965. Vol. 73. P. 30–40.
21. Jahn T.L., Bovee E.C., Griffith D. Taxonomy and evolution of Sarcodina: a reclassification. // Taxon. 1974. Vol. 23. P. 483–496.
22. Kudo R.R. Protozoology. 2nd ed. Baillière, Tindall and Cox, London. 1939.
23. Michel R., Wylezich C., Smirnov A. V. Protistology Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of // Strain. 2006. Vol. 4, № 4. P. 319–325.
24. Page F.C. *Platyamoeba stenopodia* n. g., n. sp., a freshwater amoeba. // J. Protozool. 1969. Vol. 16, № 3. P. 437–441.
25. Page F.C. A comparative study of five fresh-water and marine species of Thecamoebidae. // Trans. Am. microsc. Soc. 1971. Vol. 90, P. 157-173.
26. Page F.C. An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae. Freshwater Biol. Ass., Ambleside. 1976.
27. Page F.C. The classification of “naked” amoebae (Phylum Rhizopoda) // Arch Protistenkd. 1987. Vol. 133. P. 199–217.
28. Page F.C. Marine gymnamoebae. Institute of Terrestrial Ecology. 1983.
29. Page F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biol. Ass., Ambleside. 1988.
30. Page F.C. Nackte Rhizopoda. In: Nackte Rhizopoda Und Heliozoea (Protozoenfauna, Band 2). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York. 1991.
31. Page F.C., Blakey S.M. Cell Surface as a Taxonomic Character in the Thecamoebidae (Protozoa: Gymnamoebia) // Zool. J. Linn. Soc. 1979. Vol. 66, № 2. P. 113–135.
32. Page F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK. 1988. 112 p.
33. Page F.C. The genus *Thecamoeba* (Protozoa, Gymnamoebia) Species distinctions, locomotive morphology, and protozoan prey // Journal of Natural History. 1977. Vol. 11, № 1. P. 25–63.
34. Page F.C. A revised classification of the Gymnamoebia (Protozoa: Sarcodina) // Zool. J. Linn. Soc. 1976. Vol. 58, № 1. P. 61–77.
35. Reichenov E. Lehrbuch der Protozoenkunde. Gustav Fischer, Jena. 1953.
36. Sawyer T.K. Isolation and identification of free-living marine amoebae from upper chesapeake bay, Maryland // Trans. Am. Microsc. Soc. 1971. Vol. 90, № 1. P. 43–51.
37. Schaeffer A.A. Taxonomy of the Amebas. // Pap. Dept Mar Biol Carnegie Inst Wash. 1926. Vol. 24. P. 116 pp. and plates 1–12.
38. Schaeffer A.A. Taxonomy of the Amebas // Pap. Dept Mar Biol Carnegie Inst Wash. 1926. Vol. 24. P. 3–112.
39. Singh B.N. Nuclear division in nine species of small free living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. // Phil Trans Roy Soc London B. 1952. Vol. 236. P. 405–461.
40. Smirnov A. V., Brown S. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae // Protistology. 2004. Vol. 3, № 3. P. 148–190.
41. Smirnov A. V. Re-description of *Thecamoeba* munda Schaeffer 1926 (Gymnamoebia, Thecamoebidae), isolated from the Baltic Sea // European Journal of Protistology. Urban & Fischer Verlag, 1999. Vol. 35, № 1. P. 66–69.
42. Smirnov A. V. et al. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa) // Protist. 2011. Vol. 162, № 4. P. 545–570.
43. Smirnov A. V. et al. Phylogeny, Evolution, and Taxonomy of Vannellid Amoebae // Protist. 2007. Vol. 158, № 3. P. 295–324.
44. Smirnov A. V, Goodkov A. V. An Illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea) // Protistology. 1999. Vol. 1. P. 20–29.
45. Spiegel F.W., Moore D.L., Feldman J. Tychosporium acutostipes, a new protostelid which modifies the concept of the Protosteliidae // Mycologia. 1995. Vol. 87, № 2. P. 265–270.
46. Walochnik J., Wylezich C., Michel R. The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance // Exp. Parasitol. Elsevier Inc., 2010. Vol. 126, № 1. P. 4–13.
47. Wylezich C., Walochnik J., Michel R. High genetic diversity of Sappinia-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations // Parasitol. Res. 2009. Vol. 105, № 3. P. 869–873.