

УДК 575.86:593.19

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ГЕНА 28S рРНК
ПОДТВЕРЖДАЕТ РОДСТВО СВОБОДНОЖИВУЩИХ
ГЕТЕРОТРОФНЫХ И ФОТОТРОФНЫХ
Apicomplexa (Alveolata)**

© 2015 К.В. Михайлов¹, Д.В. Тихоненков^{2,3}, Я. Янушкович^{3,4},
А.Ю. Дякин⁵, М.В. Офицеров⁶, А.П. Мыльников², В.В. Алешин^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3281,
электронная почта: kv.mikhailov@belozersky.msu.ru,
Aleshin@genebee.msu.ru

² Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок;
факс: +7(48547)24-042, электронная почта: tikho-denis@yandex.ru,
mylnikov@ibiw.yaroslavl.ru

³ University of British Columbia, Department of Botany, Vancouver,
British Columbia, Canada V6T 1Z4; E-mail: janjan.cz@gmail.com

⁴ Canadian Institute for Advanced Research, Program in Integrated
Microbial Diversity, Toronto, ON, Canada M5G 1Z8;
E-mail: janjan.cz@gmail.com

⁵ Masaryk University, Faculty of Science, Department of Botany
and Zoology, Brno, Czech Republic; E-mail: ondredyakin@gmail.com

⁶ Всероссийский научно-исследовательский институт
ирригационного рыбоводства, 142460 Московская область,
Ногинский район, пос. им. Воровского, ул. Сергеева, 24;
факс: +7(496)513-7588, электронная почта: miha-akademik@ya.ru

Поступила в редакцию 07.07.15

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена большой субъединицы рибосом (LSU rRNA или 28S рРНК) свободноживущих хищных жгутиконосцев-кольподеллид *Colpodella angusta*, *Voromonas pontica*, *Alphamonas edax* (Apicomplexa) свидетельствует об их родстве с несущими функциональную пластиду автотрофными хромеридами *Chromera velia* и *Vitrella brassicaformis* и сестринских отношениях объединяющей их клады с паразитическими апикомплексами (кокцидиями, гемоспоридиями и грегаринами, или споровиками *sensu lato*). Этот результат согласуется с предыдущим заключением о монофилии кольподеллид и хромерид (хромподеллид), основанном на филогеномных данных. Выявленные родственные отношения указывают на сложный сценарий приобретения, утраты или модификации пластид и эволюции паразитизма у альвеолят.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярная филогенетика, гены рРНК, апикомплексы, споровики, гетеротрофные жгутиконосцы, пластиды, эволюция паразитизма.

Споровики – внутриклеточные паразиты животных, возбудители таких заболеваний, как малярия, токсоплазмоз, криптоспоридиоз и др. – традиционно рассматривались в учебных курсах зоологии как обособленный таксон в составе простейших. Но сравнение нуклеотидных пос-

ледовательностей рРНК обнаружило родство споровиков с водорослями – панцирными жгутиконосцами (динофлагеллятами) [1], что поставило вопрос о способах эволюционного перехода между автотрофными и гетеротрофными формами [2], а открытие у споровиков рудимента пластиды (апикопласта) [3], вовлеченного, как в настоящее время известно, в обеспечение метаболических процессов, не связанных с фотосинтезом, доказало происхождение споровиков от автотрофного предка. Исследование био-

Принятые сокращения: ОТЕ – операциональные таксономические единицы, *s.l.* – *sensu lato*, в широком смысле.

* Адресат для корреспонденции.

разнообразия жгутиконосных форм простейших добавило к паразитическим споровикам и автотрофным динофлагеллятам свободноживущих хищных родственников – кольподелл [4, 5]. Кольподеллы охотятся на других протистов, поглощая содержимое клеток жертв при помощи апикального комплекса, имеющего сходные черты организации с апикальным комплексом паразитических споровиков. Сходство апикального комплекса паразитов и свободноживущих хищников наводит на мысль, что эту часть организации клетки они унаследовали от общего гетеротрофного предка [5, 6]. Не так давно были найдены и автотрофные родственники споровиков, более близкие, чем динофлагелляты, названные хромеридами: *Chromera velia* [7] и *Vitrella brassicaformis* [8]. Они содержат в клетках функциональные пластиды, потенциально имеющие общее происхождение с апикопластом споровиков. Помимо охарактеризованных видов, в метабеномах из различных природных проб обнаружены фрагменты ДНК, происходящие от неидентифицированных родственников кольподелл и хромерид. Если родство как кольподелл, так и хромерид со споровиками показано достаточно убедительно, то их отношения между собой до недавних пор были предметом альтернативных гипотез [9–11] и нуждались в уточнении. Недавно полученные транскриптомные данные дали весомую поддержку гипотезе монофилии кольподелл и хромерид и возможность их общего наименования хромподеллидами [12]. В данной работе мы с использованием традиционного филогенетического маркера – гена 28S рРНК, а также объединенных нуклеотидных последовательностей генов 18S и 28S рРНК подтверждаем монофилию указанной клады и ее сестринские отношения со споровиками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток и секвенирование ДНК. Хищных кольподелл *Colpodella angusta* (клон Spi-2) и *Voromonas pontica* (клон G-3) выращивали с использованием в качестве жертвы бактериотрофных жгутиконосцев кинетопластид *Parabodo caudatus* (клон BAS-1) и *Procrystobia sorokini* (клон B-69) соответственно; кольподеллиду *Alphamonas edax* (клон BE-2) культивировали на гетеротрофных золотистых водорослях *Spumella* sp. (клон OF-40). Клетки жертвы выращивали на суспензии бактерий *Pseudomonas fluorescens*. Источник культур и детали культивирования описаны ранее [11]. ДНК из культур *V. pontica* и *A. edax* выделяли с помощью набора Diatom («Изоген», Россия). Перекрывающиеся фрагменты гена

28S рРНК амплифицировали с использованием Encyclo PCR Kit («Евроген», Россия) и набора праймеров [13]. Продукты ПЦР клонировали в плазмидном векторе pTZ57R («Fermentas», Литва). По полиморфизму длин фрагментов, образующихся эндонуклеазой рестрикции TaqI, среди клонов отбирали гаплотипы, содержащие фрагменты генов хищника и жертвы. Нуклеотидные последовательности рибосомных генов определяли на капиллярном секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Life Technologies», США) в ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Из культуры *C. angusta* выделяли РНК и на ее основе синтезировали кДНК с помощью SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit («Clontech», США). Библиотеку кДНК секвенировали на HiSeq2000 («Illumina, Inc.», США); контиги собирали сборщиком Inchworm (Trinity v. r2012-06-08).

Отбор последовательностей и филогенетический анализ. Средствами BLAST [14] в базах данных nr/nt и метабеномов wgs NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) был проведен поиск нуклеотидных последовательностей, сходных с 18S и 28S рРНК кольподелл, хромерид, других Apicomplexa, динофлагеллят и родственных групп, т.е. основных представителей Myzozoa [15]. Для максимального учета разнообразия из большого набора последовательностей были отобраны представители наиболее изолированных клад. Частичные нуклеотидные последовательности генов были собраны в контиги, если уровень сходства на перекрывающихся участках превышал 97%. Наименования и номера отобранных последовательностей приведены на рис. 1 и 2. Поскольку видовое разнообразие, доступное для генов 28S рРНК, ниже, чем для генов 18S рРНК, но при этом не полностью перекрывается, было сформировано два набора: один для 28S рРНК, включающий 50 операционных таксономических единиц (ОТЕ), и другой для 18S рРНК (81 ОТЕ), причем второй набор был дополнен 28S рРНК в тех случаях, когда это было возможно. Выравнивания, полученные программой MUSCLE [16], корректировали вручную в редакторе BioEdit [17]. Деревья строили в программе MrBayes 3.2.2 [18] по модели GTR с учетом доли инвариантных сайтов и гетерогенности сайтов по скорости эволюции для десяти категорий. К набору конкатенированных 18S и 28S рРНК (81 ОТЕ) все параметры, кроме топологии и длины ветвей, вычисляли отдельно по двум разделам (18S и 28S рРНК). Для каждого набора произведено 5 000 000 генераций Монте-Карло Марковских цепей в двух независимых запусках, половина отброшена при построении дерева. О достижении конвергенции судили по значениям

PSRF [19]. Для оценки бутстрэп-поддержек узлов байесовых деревьев была использована программа RAxML [20], выполняющая поиск топологий методом максимального правдоподобия. Для RAxML были выбраны следующие параметры анализа: модель эволюции GTR с четырьмя категориями для учета гетерогенности скорости эволюции сайтов согласно гамма-распределению и оценкой доли инвариантных сайтов; для расчета значений поддержки использовали 1000 бутстрэп-реplik. Значимость отличий альтернативных топологий проверяли по байесову фактору [21], вычисляя логарифм краевого правдоподобия (marginal likelihood) командой *ss* в программе MrBayes 3.2.2 [18], и AU-тестом, реализованным в программе CONSEL [22]. Альтернативные топологии для AU-теста конструировали, перемещая одну из трех клад (*Chromera velia*, *Vitrella brassicaformis* и *Alphamonas edax* с близкими ОТЕ, при наличии таковых) по байесову дереву в редакторе TreeView [23]. Значения правдоподобия для сайтов выравнивания вычисляли, задавая параметр *-wsl* в программе TREE-PUZZLE v. 5.2 [24] при модели GTR с распределением сайтов по восьми категориям скорости эволюции и инвариантным; значения скоростей нуклеотидных замен в модель GTR вносили по результатам проведенного ранее байесова анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гены 28S рРНК кольподелл *Colpodella angusta*, *Voromonas pontica* и *Alphamonas edax* сходны по первичной структуре с соответствующими генами споровиков и динофлагеллят и не показывают заметных отклонений по длине и положению гипервариабельных участков. 28S рРНК исследованного штамма *V. pontica* на 100% совпадает на общем участке 1197 п.н. с опубликованной ранее последовательностью *V. pontica* штамма HFCC41 [25]. Помимо *V. pontica* HFCC41 в базе данных nt/nt NCBI найдено десять частичных последовательностей генов 28S рРНК из неидентифицированных видов, принадлежащих кладе кольподеллид, и одна относительно близкая к *Chromera velia* (рис. 1). Все они получены из образцов почв [26, 27] или из пещер [28]. Кроме того, в сборках морских метагеномов [29] (базы данных wgs) найдены контиги, на 98–100% совпадающие с 28S рРНК *V. pontica*. Это согласуется с наблюдением, что *Voromonas* является морским родом [12]. Его можно охарактеризовать как наиболее массовую в океаническом планктоне кольподеллу, поскольку это единственный род кольподелл, найденный в ме-

тагеномных базах данных wgs океанического планктона.

Байесово дерево 28 рРНК (рис. 1) построено по достижению сходимости двух независимых запусков согласно использованному критерию [19]. Оно объединяет с апостериорной вероятностью 0,95 свободноживущих кольподелл, оба вида хромерид и родственные неидентифицированные виды в общую кладу, недавно названную хромподеллидами [12]. Первой среди них отделяется ветвь автотрофного вида *Vitrella brassicaformis*, затем гетеротрофного *A. edax*, оставшаяся клад объединяет гетеротрофные виды *C. angusta* и *V. pontica* и автотрофный вид *Chromera velia*. Таким образом, гетеротрофные и автотрофные виды перемешаны на дереве и не образуют монофилетических групп по типу питания. Топология дерева 28S рРНК хромподеллид идентична полученной при филогенетическом анализе конкатенированных аминокислотных последовательностей 85 белков, реконструированных из транскриптомных данных [12], а хромподеллиды в целом являются сестринской группой по отношению к остальным, паразитическим Apicomplexa (споровикам). Разделение последних на кладу кокцидий и гемоспоридий и кладу грегаринов и *Cryptosporidium* spp. соответствует общепринятым представлениям [30].

Ближайшая к Apicomplexa внешняя группа – другие представители Myzozoa [1, 15], обозначаемые здесь *Dinozoa sensu lato*: динофлагелляты (т.е. *Dinozoa sensu stricto*), перкинсииды [31] и родственные таксоны – включает виды с разной скоростью молекулярной эволюции, поэтому для точности реконструкции филогенетического дерева Apicomplexa важна их представительная выборка. Но только для небольшого числа видов этой группы, за исключением динофлагеллят, доступны гены 28S рРНК. Для большей представленности субклад в набор включены последовательности 28S рРНК *Perkinsus* и псевдогена цилиофриидного солнечника *Ciliophrys infusionum*, приобретенного горизонтальным переносом от неизвестной, возможно, паразитической перкинсииды [32], а также морских альвеолят группы I (MALV-I) [33–36] и частичные последовательности Syndiniales: *Syndinium turbo* (MALV-IV) и *Amoebophrya* spp. (MALV-II) [36, 37]. Полный рибосомный оперон неизвестного представителя группы MALV-II доступен под именем HF0200_37F04 (EU795185, GenBank). Его принадлежность к MALV-II доказывается сходством с *Amoebophrya* spp. в нуклеотидных последовательностях генов 18S и 28S рРНК. Кроме того, контиг, собранный из разных wgs-библиотек [29, 38], представляющих метагеном океанического планктона (AACY022815131,

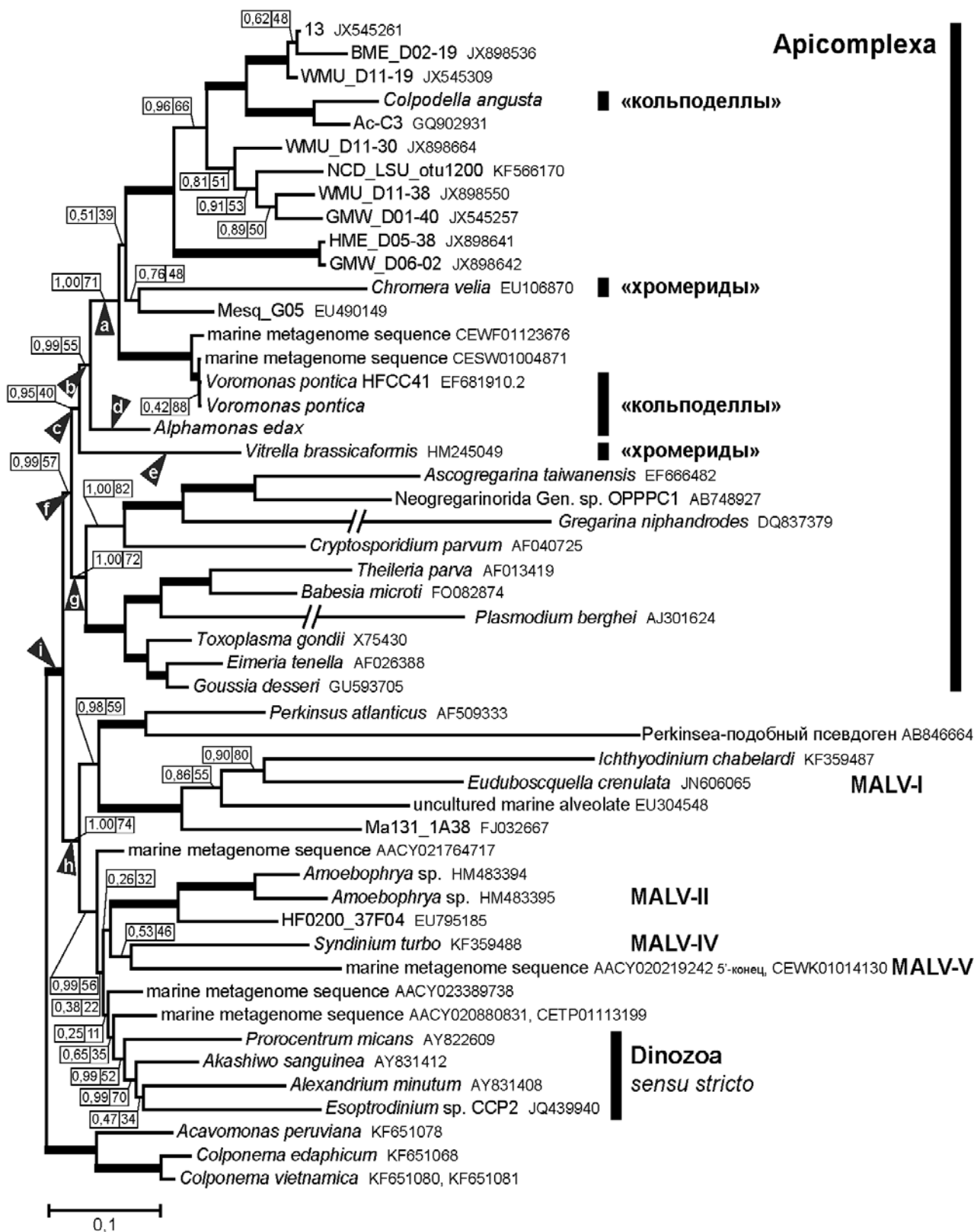


Рис. 1. Байесово дерево 28S рДНК. Ребра с апостериорной вероятностью и индексом ML бутстрэпа >90% выделены жирным; для остальных приведены значения апостериорной вероятности/индекса бутстрэпа. Длина ребер к *Gregarina niphandrodes* и *Plasmodium berghei* сокращена на треть от вычисленной. Серыми треугольниками (а–i) показаны места перемещения клад для AU-теста (значения вероятностей см. в табл. 2)

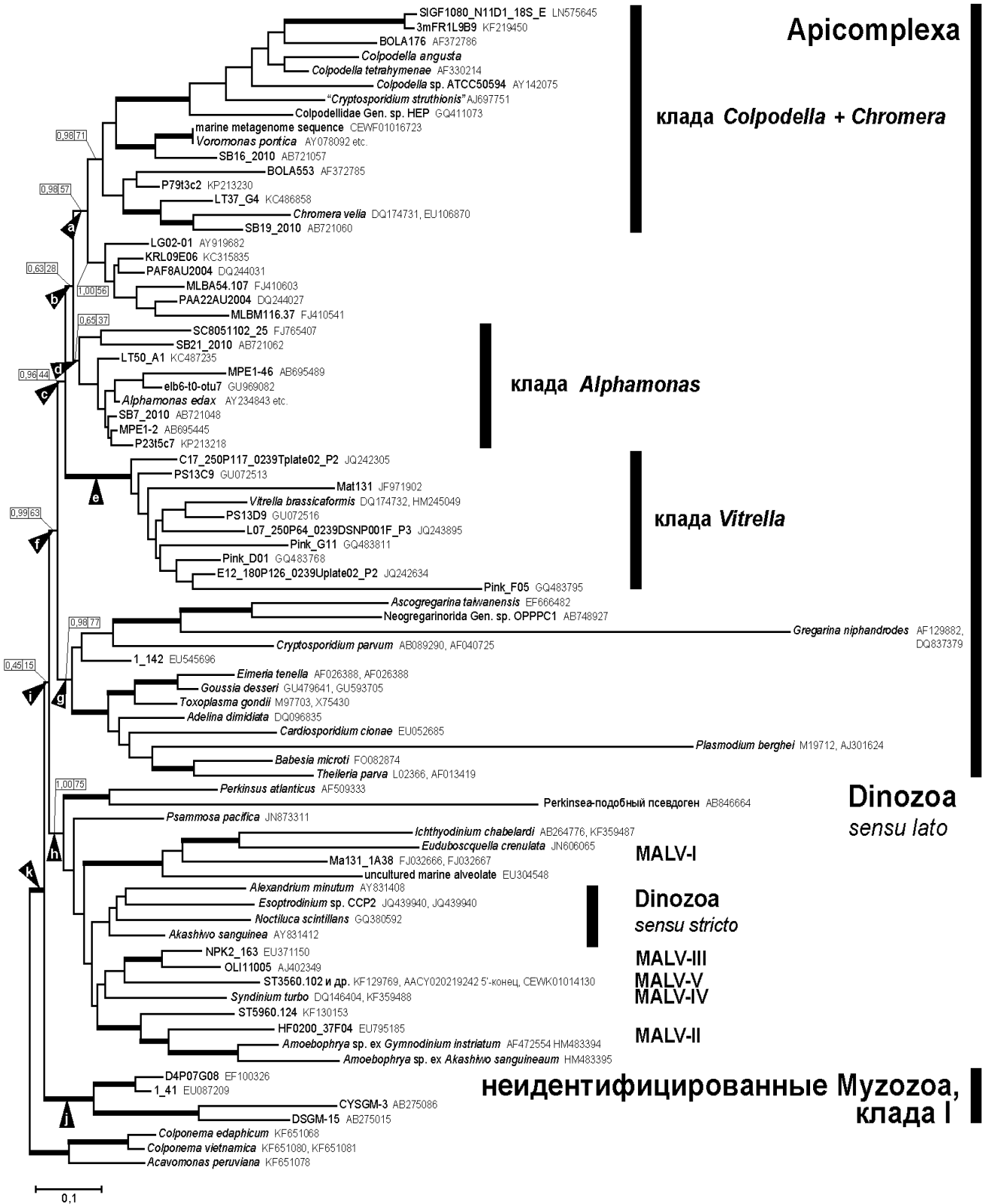


Рис. 2. Байесово дерево, построенное по комбинированному выравниванию 18S рРНК, дополненному 28S рРНК для тех ОТЕ, где возможно. Ребра с апостериорной вероятностью и индексом ML бутстрэпа >90% выделены жирным; для остальных обсуждаемых групп приведены значения апостериорной вероятности/индекса бутстрэпа. Серыми треугольниками (а–к) показаны места перемещения клад для AU-теста (значения вероятностей см. в табл. 2)

CEWK01014130 и AACU020219242, 5'-конец; GenBank), перекрывается на участке 415 п.н. (с единственной нуклеотидной заменой) с последовательностью 18S рРНК, отнесенной к MALV-V [39]. На этом основании мы приписываем полученный контиг группе MALV-V. Помимо этого несколько последовательностей из морских метагеномов занимают на дереве особое положение, и их принадлежность к ранее выделенным таксонам не установлена (рис. 1).

Большинство группировок, особенно Arcoptrexa, получают в байесовом дереве высокие значения апостериорной вероятности. Бутстрэп-поддержка этих узлов, в т.ч. относящихся к хромподеллидам, при анализе методом максимального правдоподобия оказывается не такой высокой (рис. 1). По этой причине мы провели проверку статистической значимости филогенетических гипотез, следующих из байесова анализа. Байесов фактор [21] при введении топологических ограничений (constraint) строго свидетельствует в пользу монофилии хромподеллид (табл. 1). AU-тест отвергает любое иное положение хромериды *Chromera velia* (при перемещении по дереву вместе с сестринской ОТЕ Mesq_G05; EU490149, GenBank), кроме как в составе клады с *C. angusta* и *V. pontica* (табл. 2), и любое иное положение *A. edax*, кроме максимально правдоподобного или же в составе монофилетической группы с *V. brassicaformis*. При этом AU-тест не отвергает некоторые другие варианты перемещений *V. brassicaformis* по дереву (табл. 2).

При помощи фрагментов гена 18S рРНК из различных природных субстратов и немногих идентифицированных видов [5, 15, 40, 41] можно расширить число ОТЕ, относящихся к кольподеллам или хромеридам, но существенного увеличения разнообразия при этом не достигается, т.к. большинство ОТЕ принадлежат к одной из четырех описанных выше клад. Пятая

Таблица 1. Логарифм краевого правдоподобия при топологических ограничениях

Вид данных	Вводимое топологическое ограничение	
	монофилия хромподеллид принимается	монофилия хромподеллид отвергается
28S рРНК	-38350,98	-38384,73
18S и 28S рРНК	-63538,05	-63596,79

Таблица 2. Вероятность альтернативных топологий (AU-тест)

Место перемещения	Перемещаемая клада (наименование по идентифицированному виду)		
	« <i>Chromera velia</i> »	« <i>Alphamonas edax</i> »	« <i>Vitrella brassicaformis</i> »
	Дерево 28S рРНК		
a	0,643	—	0,018 ^a
b	0,018*	—	—
c	0,004*	0,018*	—
d	0,003*	—	0,276
e	0,044*	0,276	—
f	3e-009*	0,006*	0,020*
g	8e-008*	0,008*	0,470
h	1e-006*	0,003*	0,008*
i	1e-005*	0,002*	0,224
	Дерево комбинированных 18S и 28S рРНК		
a	0,035*	—	0,019*
b	2e-004*	—	—
c	0,001*	0,019*	—
d	1e-007*	—	0,613
e	2e-004*	0,613	—
f	2e-004*	0,003*	0,002*
g	3e-004*	5e-008*	0,379
h	6e-005*	6e-072*	3e-005*
i	9e-005*	7e-029*	0,019*
j	8e-006*	9e-097*	0,019*
k	1e-031*	8e-094*	0,020*

Примечание. Места перемещений для 28S рРНК и комбинированных данных отмечены на рис. 1 и 2.

* Отличие правдоподобия данной топологии от байесовой статистически значимо.

клада, не имеющая идентифицированных в настоящее время видов [12], как и известных каких-либо иных генов, помимо 18S рРНК, объединяется с кладой, включающей рода *Colpodella*, *Chromera* и *Voromonas*. На комбинированном дереве (построенном по нуклеотидным последовательностям 18S рРНК, дополненных при возможности последовательностями 28S рРНК) они объединяются с апостериорной вероятностью 0,97 (рис. 2). В целом топология комбинированного дерева согласуется с топологией дерева 28S рРНК, близки и значения апостериорных вероятностей и индексов бутстрэпа для одноименных клад. Так же как и для 28S рРНК, для комбинированных данных при введении топологического ограничения байесов фактор строго свидетельствует в пользу монофилии хромподеллид (табл. 1). AU-тест (табл. 2) отвергает все нарушения монофилии хромподеллид,

а также взаиморасположения их крупнейших клад, за исключением объединения клады *V. brassicaformis* с кладой *A. edax* (вероятность 0,613) или с паразитическими Apicomplexa (вероятность 0,379).

Тогда как для Apicomplexa топологии деревьев 28S рРНК и комбинированного 18S и 28S рРНК являются согласованными, а их статистические характеристики близки, для клады перкинсиид/динофлагеллят имеются отличия в топологии деревьев. По-видимому, они связаны с более полной таксономической выборкой 18S рРНК, в которой присутствуют нуклеотидные последовательности *Psammoma* [42] и морских альвеолят MALV-III. Дополнительно выборку фрагментов гена 18S рРНК расширяют неидентифицированные Myzozoa, недавно обозначенные как «клада I» [12]. Это небогатая видами группа, равноудаленная от Apicomplexa и Dinozoa *sensu lato*. Гены ее представителей обнаружены в обедненных кислородом прибрежных [43] и глубоководных морских осадках [44, 45] или в накопительной культуре, полученной в анаэробных условиях из глубоководного метанового сипа [45]. Один из филотипов (CYSGM-3; AB275086, GenBank) найден только в накопительной культуре, но не в исходной пробе, что можно трактовать в пользу его размножения в условиях гетеротрофной анаэробной культуры. На опубликованных ранее филогенетических деревьях «клада I» размещалась в корне Dinozoa *s.l.* с низкой статистической поддержкой [11, 12, 45]. При тестировании альтернативных топологий для выравнивания 81 ОТЕ AU-тест оценивает вероятность объединения «клад I» с Dinozoa *s.l.*, апикомплексами, споровиками и хромподеллидами в 0,747, 0,746, 0,15 и 0,013 соответственно, а вероятность топологии, ставящей «кладу I» в корень Myzozoa (рис. 2), равна 0,747. Т.е. трем возможным вариантам взаимоположения основных клад Myzozoa: Apicomplexa, Dinozoa *s.l.* и «клада I» – тест придает равную вероятность. Получение более подробных сведений по морфологии, образу жизни и генетике видов из «клад I» представляет несомненный интерес.

Прежние гипотезы о филогенетических отношениях кольподеллид и хромерид основываются, по большей части, на таксономически бедных или ограниченных по длине выравниваниях генов 18S рРНК и плохо согласуются между собой. Среди таких гипотез фигурировали следующие: монофилия кольподеллид, но на выборке, не включающей хромерид [41]; монофилия *Colpodella* с Apicomplexa, а *Voromonas* и *Alphamonas* – с Dinozoa *s.l.* [15]; кольподеллиды и

хромериды образуют смешанные клады (*Colpodella* + *Voromonas* + *Chromera*) и (*Alphamonas* + *Vitrella*), которые монофилетичны [10] либо парафилетичны [9] относительно споровиков, или образуют с ними неразрешенную трихотомию [11]; множественная парафилия кольподеллид (см. рис. 1 в работе Янушковича с соавт. [12]). Представленный в настоящей работе филогенетический анализ расширенной таксономической выборки генов 28S рРНК (рис. 1), равно как и в их комбинации с 18S рРНК (рис. 2), на высоком уровне значимости объединяет фотосинтетические водоросли хромериды (*Chromera* и *Vitrella*) и хищные жгутиконосцы кольподеллиды (*Colpodella*, *Voromonas*, *Alphamonas*) в единую монофилетическую группу, ближайшими родственниками которой являются паразитические Apicomplexa (споровики). Полученное дерево полностью идентично по топологии основных клад дереву 85 белков [12], отличаясь только меньшей поддержкой ребра между ответвлением клад «*Vitrella brassicaformis*» и «*Alphamonas edax*»: AU-тест для рРНК не исключает монофилии группы, объединяющей кладу «*Vitrella brassicaformis*» и «*Alphamonas edax*» [9–11], хотя правдоподобие такой топологии не максимальное. В пользу максимально правдоподобного дерева рРНК свидетельствует также синапоморфия *A. edax*, *C. angusta* и *V. pontica* [12]: перемещение в ядро гена *sufB*, выполняющего неустановленную функцию в биогенезе железосерных кластеров FeS; у *V. brassicaformis* ген *sufB* сохраняет предковую локализацию в геноме пластиды. Согласованность дерева традиционного филогенетического маркера – рРНК с филогенным устраняет прежние противоречия и консолидирует нынешнее представление о филогении кольподеллид и хромерид.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (филогенетический анализ – грант 14-50-00029, определение нуклеотидных последовательностей *C. angusta* – грант 14-14-00515), РФФИ (гранты для определения нуклеотидных последовательностей других видов – 14-04-00554, 15-34-20065 и 15-29-02518), а также программы президента РФ (грант МК-7436.2015.4). Работа с базами данных поддержана грантом Европейского центра ихтиопаразитологии ЕСИР No. GBP505/12/G112.

Вычисления выполнены с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gajadhar, A.A., Marquardt, W.C., Hall, R., Gunderson, J., Ariztia-Carmona, E.V., and Sogin, M.L. (1991) Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates, *Biochem. Parasitol.*, **45**, 147–154.
- Мухина В.С. (2014) Возникновение и эволюция пластид, *Журн. общ. биол.*, **75**, 329–352.
- McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J., and Lang-Unnasch, N. (1996) Plastid in human parasites, *Nature*, **381**, 482.
- Крылов М.В., Мыльников А.П. (1986) Новые таксоны в типе Sporozoa, Spiromonadomorpha subcl. n. Spiromonadida ordo n., *Паразитология*, **20**, 425–430.
- Kuvarina, O.N., Leander, B.S., Aleshin, V.V., Mylnikov, A.P., Keeling, P.J., and Simdyanov, T.G. (2002) The phylogeny of colpodellids (Alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to apicomplexans, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **49**, 498–504.
- Leander, B.S., and Keeling, P.J. (2003) Morphostasis in alveolate evolution, *Trends Ecol. Evol.*, **18**, 395–402.
- Moore, R.B., Obornik, M., Janouskovec, J., Chrudimsky, T., Vancova, M., Green, D.H., Wright, S.W., Davies, N.W., Bolch, C.J., Heimann, K., Slapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J.M., and Carter, D.A. (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites, *Nature*, **451**, 959–963.
- Obornik, M., Modry, D., Lukes, M., Cernotikova-Stribrna, E., Cihlar, J., Tesarova, M., Kotabova, E., Vancova, M., Prasil, O., and Lukes, J. (2012) Morphology, ultrastructure and life cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a novel chromerid from the Great Barrier Reef, *Protist*, **163**, 306–323.
- Cavalier-Smith, T. (2014) Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa, *Eur. J. Protistol.*, **50**, 472–495.
- Gile, G.H., and Slamovits, C.H. (2014) Transcriptomic analysis reveals evidence for a cryptic plastid in the colpodellid *Voromonas pontica*, a close relative of chromerids and apicomplexan parasites, *PLoS One*, **9**, e96258.
- Mikhailov, K.V., Janouskovec, J., Tikhonenkov, D.V., Mirzaeva, G.S., Diakin, A.Y., Simdyanov, T.G., Mylnikov, A.P., Keeling, P.J., and Aleoshin, V.V. (2014) A complex distribution of elongation family GTPases EF1A and EFL in basal alveolate lineages, *Genome Biol. Evol.*, **6**, 2361–2367.
- Janouskovec, J., Tikhonenkov, D.V., Burki, F., Howe, A.T., Kolisko, M., Mylnikov, A.P., and Keeling, P.J. (2015) Factors mediating plastid dependency and the origins of parasitism in apicomplexans and their close relatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10200–10207.
- Van der Auwera, G., Chapelle, S., and De Wachter, R. (1994) Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes, *FEBS Lett.*, **338**, 133–136.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
- Cavalier-Smith, T., and Chao, E.E. (2004) Protalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.), *Eur. J. Protistol.*, **40**, 185–212.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95–98.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., and Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space, *Syst. Biol.*, **61**, 539–542.
- Gelman, A., and Rubin, D.B. (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences, *Stat. Sci.*, **7**, 457–472.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies, *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
- Kass, R.E., and Raftery, A.E. (1995) Bayes factors, *J. Am. Stat. Assoc.*, **90**, 773–795.
- Shimodaira, H., and Hasegawa, M. (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection, *Bioinformatics*, **17**, 1246–1247.
- Page, R.D. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Appl. Biosci.*, **12**, 357–358.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., and von Haeseler, A. (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing, *Bioinformatics*, **18**, 502–504.
- Wylezich, C., Nies, G., Mylnikov, A.P., Tautz, D., and Arndt, H. (2010) An evaluation of the use of the LSU rRNA D1-D5 domain for DNA-based taxonomy of eukaryotic protists, *Protist*, **161**, 342–352.
- Beloqui, A., Nechitaylo, T.Y., Lopez-Cortes, N., Ghazi, A., Guazzaroni, M.E., Polaina, J., Strittmatter, A.W., Reva, O., Waliczek, A., Yakimov, M.M., Golyshina, O.V., Ferrer, M., and Golyshin, P.N. (2010) Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 5934–5946.
- Hollister, E.B., Schadt, C.W., Palumbo, A.V., Ansley, R.J., and Boutton, T.W. (2010) Structural and functional diversity of soil bacterial and fungal communities following woody plant encroachment in the southern Great Plains, *Soil Biol. Biochem.*, **42**, 1816–1824.
- Zhang, T., Victor, T.R., Rajkumar, S.S., Li, X., Okoniewski, J.C., Hicks, A.C., Davis, A.D., Broussard, K., LaDeau, S.L., Chaturvedi, S., and Chaturvedi, V. (2014) Mycobiome of the bat white nose syndrome affected caves and mines reveals diversity of fungi and local adaptation by the fungal pathogen *Pseudogymnoascus (Geomyces) destructans*, *PLoS One*, **9**, e116149.
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Le Bescot, N., Probert, I., Carmichael, M., Poulain, J., Romac, S., Colin, S., Aury, J.M., Bittner, L., Chaffron, S., Dunthorn, M., Engelen, S., Flegontova, O., Guidi, L., Horak, A., Jaillon, O., Lima-Mendez, G., Lukes, J., Malviya, S., Morard, R., Mulot, M., Scalco, E., Siano, R., Vincent, F., Zingone, A., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Kandels-Lewis, S., Tara Oceans Coordinators Acinas, S.G., Bork, P., Bowler, C., Gorsky, G., Grimsley, N., Hingamp, P., Iudicone, D., Not, F., Ogata, H., Pesant, S., Raes, J., Sieracki, M.E., Speich, S., Stemmann, L., Sunagawa, S., Weissenbach, J., Wincker, P., and Karsenti, E. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean, *Science*, **348**, 1261605, doi: 10.1126/science.1261605.
- Carreno, R.A., Martin, D.S., and Barta, J.R. (1999) *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences, *Parasitol. Res.*, **85**, 899–904.
- Siddall, M.E., Reece, K.S., Graves, J.E., and Burrenson, E.M. (1997) Total evidence refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa, *Parasitology*, **115**, 165–176.

32. Yabuki, A., Toyofuku, T., and Takishita, K. (2014) Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: an emerging concern for molecular ecology of microbial eukaryotes, *ISME J.*, **8**, 1544–1547.
33. Massana, R., Karniol, B., Pommier, T., Bodaker, I., and Beja, O. (2008) Metagenomic retrieval of a ribosomal DNA repeat array from an uncultured marine alveolate, *Environ. Microbiol.*, **10**, 1335–1343.
34. Marande, W., Lopez-Garcia, P., and Moreira, D. (2009) Eukaryotic diversity and phylogeny using small- and large-subunit ribosomal RNA genes from environmental samples, *Environ. Microbiol.*, **11**, 3179–3188.
35. Coats, D.W., Bachvaroff, T.R., and Delwiche, C.F. (2012) Revision of the family Duboscquellidae with description of *Euduboscquella crenulata* n. gen., n. sp. (Dinoflagellata, Syndinea), an intracellular parasite of the ciliate *Favella panamensis* Kofoid & Campbell, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**, 1–11.
36. Lepelletier, F., Karpov, S.A., Le Panse, S., Bigeard, E., Skovgaard, A., Jeanthon, C., and Guillou, L. (2014) *Parvilucifera rostrata* sp. nov. (Perkinsozoa), a novel parasitoid that infects planktonic dinoflagellates, *Protist*, **165**, 31–49.
37. Coats, D.W., Kim, S., Bachvaroff, T.R., Handy, S.M., and Delwiche, C.F. (2010) *Tintinnophagus acutus* n. g., n. sp. (Phylum Dinoflagellata), an ectoparasite of the ciliate *Tintinnopsis cylindrica* Daday 1887, and its relationship to *Duboscquodinium collini* Grasse 1952, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **57**, 468–482.
38. Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H., and Smith, H.O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, **304**, 66–74.
39. Wu, W., Huang, B., Liao, Y., and Sun, P. (2014) Picoeukaryotic diversity and distribution in the subtropical-tropical South China Sea, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **89**, 563–579.
40. Siddall, M.E., Reece, K.S., Nerad, T.A., and Bureson, E.M. (2001) Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata), *Am. Mus. Novitates*, **3314**, 1–10.
41. Leander, B.S., Kuvardina, O.N., Aleshin, V.V., Mylnikov, A.P., and Keeling, P.J. (2003) Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): insights into the phagotrophic ancestry of apicomplexans, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **50**, 334–340.
42. Okamoto, N., Horak, A., and Keeling, P.J. (2012) Description of two species of early branching dinoflagellates, *Psammosa pacifica* n. g., n. sp. and *P. atlantica* n. sp., *PLoS One*, **7**, e34900.
43. Stoeck, T., Kasper, J., Bunge, J., Leslin, C., Ilyin, V., and Epstein, S. (2007) Protistan diversity in the Arctic: a case of paleoclimate shaping modern biodiversity? *PLoS One*, **2**, e728.
44. Park, S.J., Park, B.J., Pham, V.H., Yoon, D.N., Kim, S.K., and Rhee, S.K. (2008) Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea, *J. Microbiol.*, **46**, 244–249.
45. Takishita, K., Yubuki, N., Kakizoe, N., Inagaki, Y., and Maruyama, T. (2007) Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures, *Extremophiles*, **11**, 563–576.

**PRIMARY STRUCTURE OF 28S rRNA GENE CONFIRMS
MONOPHYLY OF FREE-LIVING HETEROTROPHIC
AND PHOTOTROPHIC Apicomplexa (Alveolata)**

**K. V. Mikhailov¹, D. V. Tikhonenkov^{2,3}, J. Janouskovec^{3,4},
A. Yu. Diakin⁵, M. V. Officerov⁶, A. P. Mylnikov², V. V. Aleoshin^{1*}**

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3181, E-mail: kv.mikhailov@belozersky.msu.ru, Aleshin@genebee.msu.ru

² Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok 152742, Russia; fax: +7(48547)24042, E-mail: tikho-denis@yandex.ru, mylnikov@ibiw.yaroslavl.ru

³ University of British Columbia, Department of Botany, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4; E-mail: janjan.cz@gmail.com

⁴ Canadian Institute for Advanced Research, Program in Integrated Microbial Diversity, Toronto, ON, Canada M5G 1Z8; E-mail: janjan.cz@gmail.com

⁵ Masaryk University, Faculty of Science, Department of Botany and Zoology, Brno, Czech Republic; E-mail: ondredyakin@gmail.com

⁶ The State Scientific Institute of Irrigation Fish Breeding, ul. Sergeeva 24, pos. Vorovskogo, Noginskij region, Moskovskaya obl. 142460, Russia; fax: +7(496)513-7588, E-mail: miha-akademik@ya.ru

Received July 7, 2015

The phylogenetic analysis based on the large subunit (LSU or 28S) ribosomal RNA sequences obtained from free-living predatory flagellates *Colpodella angusta*, *Voromonas pontica*, and *Alphamonas edax* (Apicomplexa) testifies to their close relationship with chromerids *Chromera velia* and *Vitrella brassicaformis*, which possess a functional photosynthetic plastid. Altogether, these organisms form a sistergroup to parasitic apicomplexans (coccidians, haemosporidian parasites, and gregarines, or sporozoans *sensu lato*). This result is in agreement with the previous conclusion about monophyly of chromopodellids, based on phylogenomic data and comparison of SSU rRNA sequences. The revealed relationships indicate a complex pattern of acquisition, loss, or modification of plastids and transition to parasitism during alveolate evolution.

Key words: molecular phylogenetics, ribosomal RNA genes, Apicomplexa, Sporozoa, heterotrophic flagellates, plastids, evolution of parasitism