

Молекулярная филогения амёб семейства Amoebidae (Euamoebida, Tubulinea, Amoebozoa)

Камышацкая О.^{1, 2*}, Смирнов А.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

* oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Ключевые слова: филогения; систематика; Amoebidae; Tubulinea

Мотивация и цель: Представители семейства Amoebidae (Euamoebida, Tubulinea, Amoebozoa) являются одними из самых известных для широкой аудитории амёб. Среди них, например, *Amoeba proteus*, являющаяся популярным лабораторным объектом цитологических исследований на протяжении многих десятилетий [1–8]. Несмотря на это, группа остается парадоксальным образом недоисследованной. Основное разнообразие видов представлено в пределах родов *Chaos*, *Amoeba*, в то время как представители остальных четырех родов – *Deuteroamoeba*, *Trichamoeba*, *Hydramoeba* и *Parachaos* – известны по немногочисленным, а иногда и единичным описаниям. Объем доступных молекулярных данных для семейства Amoebidae крайне ограничен. Три из шести родов остаются неизученными на молекулярном уровне, а данные по всем остальным исчерпываются всего пятью видами: двумя видами рода *Amoeba*, двумя видами рода *Chaos* и *Deuteroamoeba tucophaga* (из 17 известных). Род *Polychaos*, до недавнего времени включаемый в состав семейства Amoebidae на основе морфологических признаков, был перенесен в семейство Hartmannellidae (Euamoebida, Tubulinea) на основе молекулярно-филогенетического анализа [9, 10]. Это показало несостоятельность синапоморфных признаков для групп амёб отряда Euamoebida, описывающих исключительно морфологические характеристики амёб. Таким образом, исследование эволюционных взаимосвязей между амёбами отряда Euamoebida является актуальной задачей.

Дополнительную проблему при изучении этих амёб представляют сложность получения стабильных лабораторных культур, а также постоянное присутствие в их цитоплазме многочисленных пищевых вакуолей (содержащих широкий спектр про- и эукариотических организмов) и наличие прокариотических эндосимбионтов. Все это затрудняет получение неконтаминированных образцов тотальной ДНК амёб и амплификацию отдельных генов методом прямого ПЦР. Современные методы одноклеточной геномики позволяют получить молекулярные данные, используя небольшое количество клеток или отдельные ядра [9].

Методы и алгоритмы: Для изоляции ДНК клетки амёб отбирали в 40 мл пластиковые чашки Петри со стерильной фильтрованной (размер пор 0.22 µm) минеральной средой PJ [11]. В течение трех дней клетки голодали, смена минеральной среды на свежую производилась каждый день. Отсутствие видимых пищевых вакуолей проверяли, наблюдая амёб в чашках при помощи инвертированного микроскопа Leica DMI 3000, оснащенного фазово-контрастной оптикой. Далее индивидуальные клетки амёб три раза отмывали в свежей порции стерильной фильтрованной среды и помещали в 200-µl ПЦР-пробирки. Клетки

амеб с наиболее крупными ядрами были помещены в отдельные чашки со стерильной фильтрованной средой, после чего разрушены при помощи интенсивного пипетирования. Индивидуальные ядра были перенесены в свежую порцию среды при помощи тонкого капилляра. Затем отмывались последовательно в трех сменах свежей стерильной среды и, наконец, помещались в ПЦР-пробирки объемом 200 µl с небольшим объемом среды.

Экстракцию ДНК из отдельных клеток и ядер осуществляли при помощи PicoPure DNA Extraction Kit (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Далее была произведена полногеномная амплификация ядерной ДНК с использованием набора для амплификации ДНК отдельных клеток REPLI-g (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Полученные продукты секвенировали с помощью системы Illumina HiSeq 2500. Для каждого образца было получено 25 млн парных прочтений длиной 150 п. н. Проверка контроля качества необработанных данных последовательностей проводилась с использованием FastQC: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Для сборки митохондриального генома *de novo* использовали ассемблер SPAdes [12]. Полученные для каждого образца контиги, содержащие идентичные фрагменты гена 18S рРНК, были идентифицированы с помощью BLAST [13].

Полученные последовательности были смонтированы в выравнивании, содержащем все полученные последовательности видов амев семейства Amoebidae, репрезентативного набора Hartmannellidae, других Tubulinea и ряда последовательностей Discosea, используемых в качестве внешней группы. Выравнивание последовательностей производилось автоматически с использованием алгоритма Muscle, реализованного в SeaView 4.0 [14]. Первоначальный выбор нуклеотидных сайтов для вывода дерева осуществляли с использованием GBLOCKS [15]. Филогенетический анализ проводили с использованием метода максимального правдоподобия, реализованного в программе RAxML [16], с моделью GTR + γ. Байесовский анализ того же набора данных был выполнен с использованием MrBayes 3.2.6, модели GTR с гамма-коррекцией межсайтовых вариаций скорости (8 категорий) и коварионной модели [17]. Программы RAxML и MrBayes запускались на веб-сайте Cipres V.3.3 [18].

Результаты: Главным результатом стала наиболее полная по сравнению с предыдущими работами реконструкция молекулярной филогении семейства Amoebidae. Наши данные показывают, что род *Deuteroamoeba* является независимым родом семейства Amoebidae, что подтверждает морфологические данные. Он надежно группируется с родами *Chaos* и *Amoeba*. Полностью поддерживаемым является семейство Amoebidae в целом. Амебы рода *Polychaos* надежно группируются с амебами семейства Hartmannellidae, а не Amoebidae.

Выводы: Таким образом, семейство Amoebidae, одно из классических семейств голых лобозных амев, является парафилетическим таксоном и требует ревизии. Таксономические критерии для этого семейства амев требуют серьезного пересмотра. В настоящее время главной задачей остается поиск новых таксономических признаков, которые можно использовать в качестве синапоморфных для классификации этих организмов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-24-00264 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Биобанк» и «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

Molecular phylogeny of amoeba family Amoebidae (Euamoebida, Tubulinea, Amoebozoa)

Kamyshatskaya O.^{1, 2*}, Smirnov A.¹

¹ Saint Petersburg University, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia

* oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Key words: phylogeny; systematics; Amoebidae; Tubulinea

Motivation and Aim: Amoebae of the family Amoebidae (Euamoebida, Tubulinea, Amoebozoa) are among the most popular and recognizable protists. *Amoeba proteus*, for example, has been one of the most popular objects in the multiple cytological investigations for many years [1–8]. However, the species diversity of this group remains poorly studied. The main diversity of this group is represented within the genera *Chaos* and *Amoeba*. While representatives of the other four genera *Deuteroamoeba*, *Trichamoeba*, *Hydramoeba* and *Parachaos* are known from a few descriptions. Molecular data are available for a limited number of species: two species of the genus *Amoeba*, two species of the genus *Chaos* and *Deuteroamoeba mycophaga* (out of 17 known). Recent study of molecular phylogeny of the genus *Polychaos* [9, 10] resulted to its transfer from family Amoebidae to family Hartmannellidae (Euamoebida, Tubulinea). This emphasized the inconsistency of synapomorphic characters, which are described exclusively by the morphological features of amoebae, for groups of amoebae within order Euamoebida. Thus, the study of the evolutionary relationships between amoebae of the order Euamoebida is an extremely urgent task.

It is really hard to obtain stable laboratory cultures of these amoebae. Many of them are large polyphagous organisms, feeding on a wide spectrum of prokaryotic and eukaryotic food. The problem is further complicated because these amoebae contain numerous endocytobionts in the cytoplasm. As a result, preparations of the total DNA obtained from these organisms usually are heavily contaminated and cannot be used for the amplification of amoebae genes by conventional PCR methods. However the modern techniques of single-cell genomics make it possible to obtain molecular data using a small number of cells or individual nuclei [9].

Methods and Algorithms: The DNA isolation was performed with individual amoeba cells or nuclei were transferred into 40 mm plastic Petri dishes filled with Millipore-filtered (0.22 µm) PJ medium [11], and left to starve for three days. Every day the medium was replaced with the fresh one. The cells were examined using an inverted Leica DMI 3000 microscope equipped with phase-contrast optics to check for the absence of visible food vacuoles. After that, one cell was collected, washed in three subsequent changes of PJ medium, and placed with 1–2 µl of the medium in 200-µl PCR tubes. Another cell was transferred to the fresh dish filled with the sterile medium and destroyed by intensive pipetting. The nucleus of the amoeba was picked out using tapered-tip glass Pasteur pipette, washed in three subsequent changes of the same medium and placed with 1–2 µl of the medium in a 200 µl PCR tube. DNA from the single cell and from the isolated nucleus was extracted using Arcturus PicoPure DNA Extraction Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The extraction mixture was prepared according to the manufacturer's instructions. Then, 10 µl of the mixture

was added to the tube containing the single cell/nucleus. Further, we performed the whole genome amplification of the nuclear DNA using REPLI-g Single Cell DNA Amplification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. The resulting MDA products were sequenced using Illumina HiSeq 2500. For each sample there were obtained ca. 25 mln paired reads with length 150 bp. Quality control check of raw sequence data was performed using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). SPAdes assembler was used for de novo mitochondrial genome assembly [12]. Contigs containing individual 18S rRNA gene fragments obtained for each sample were identified using BLAST [13]. The obtained sequences were mounted in the alignment containing all sequences of amoebae species of the family Amoebidae, a representative set of Hartmannellidae, other Tubulinea, and a number of discosean sequences used as an outgroup. Sequences were automatically aligned using the Muscle algorithm as implemented in SeaView 4.0 [14]. Initial selection of nucleotide sites for tree inference was done using GBlocks [15]. The phylogenetic analysis was performed using maximum likelihood method as implemented in RAxML program [16] with GTR + γ model. Bayesian analysis of the same dataset was performed using MrBayes 3.2.6, GTR model with gamma correction for intersite rate variation (8 categories), and the covarion model [17]. RAxML and MrBayes programs were run at Cipres V.3.3 website [18].

Results: The main result of our work is the most complete reconstruction of the molecular phylogeny of the family Amoebidae compared to the previous works. Our data indicate that the genus *Deuteroamoeba* is an independent genus of the family Amoebidae, which is supported by morphological data. It is reliably grouped with the genera *Chaos* and *Amoeba*. The family Amoebidae as a whole is fully supported. Amoebas of the genus *Polychaos* are reliably grouped with amoebas of the family Hartmannellidae, not Amoebidae.

Conclusion: Thus, the family Amoebidae – one of the classic families of naked lobose amoebae, is a paraphyletic taxon and requires revision.

The taxonomic criteria for this family require serious revision. Currently, we need the new view aimed to define novel taxonomic characters that can be used as synapomorphic to define higher-level groups of Euamoebida and related taxa.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation project 23-24-00264. This study utilized equipment of the Core Facility Centers “Biobank”, “Development of Molecular and Cell Technologies” and “Culture Collection of Microorganisms” of the Research Park of Saint Petersburg State University.

Список литературы/References

1. Prescott D.M. Relations between cell growth and cell division: I. Reduced weight, cell volume, protein content, and nuclear volume of *Amoeba proteus* from division to division. *Exp Cell Res.* 1955;9(2):328-337
2. Roth L.E., Obetz S.W., Daniels E.W. Electron microscopic studies of mitosis in amebae: I. *Amoeba proteus*. *J Cell Biol.* 1960;8(1):207-220
3. Jeon K.W., Jeon M.S. Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in *Amoeba proteus*. *J Cell Biol.* 1975;67(1):243-249
4. Dembo M. Mechanics and control of the cytoskeleton in *Amoeba proteus*. *Biophys J.* 1989;55(6):1053-1080
5. Korohoda W., Golda J., Sroka J., Wojnarowicz A., Jochym P., Madeja Z. Chemotaxis of *Amoeba proteus* in the developing pH gradient within a pocket-like chamber studied with the computer assisted method. *Cell Motil Cytoskeletol.* 1997;38(1):38-53
6. Pomorski P., Krzemiński P., Wasik A., Wierzbicka K., Barańska J., Kłopocka W. Actin dynamics in *Amoeba proteus* motility. *Protoplasma.* 2007;231:31-41

7. Berdieva M., Bogolyubov D., Podlipaeva Y., Goodkov A. Nucleus-associated actin in *Amoeba proteus*. *Eur J Protistol.* 2016;56:191-199
8. Carrasco-Pujante J., Bringas C., Malaina I. et al. Associative conditioning is a robust systemic behavior in unicellular organisms: an interspecies comparison. *Front Microbiol.* 2021;12:707086
9. Kamyshatskaya O.G., Bondarenko N.I., Mesentsev Y.S., Chistyakova L.V., Nassonova E.S., Smirnov A.V. Molecular phylogeny of *Polychaos annulatum* (Amoebozoa, Tubulinea, Euamoebida) shows that genus *Polychaos* belongs to the family Hartmannellidae. *J Eukaryot Microbiol.* 2020;67:321-326
10. Kamyshatskaya O., Bondarenko N., Nassonova E., Smirnov A. *Polychaos centronucleolus* n. sp. – a new terrestrial species of the genus *Polychaos* (Amoebozoa, Tubulinea) with nontypical nuclear structure. *Eur J Protistol.* 2021;77:125759
11. Prescott D.M., James T.W. Culturing of *Amoeba proteus* on *Tetrahymena*. *Exp Cell Res.* 1955;81:256-258. doi 10.1016/0014-4827(55)90067-7
12. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19:455-477
13. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-3402
14. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. Sea view version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 2010;27:221-224
15. Cestresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Ecular Biol Evol* 2000;17(4):540-552
16. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1312-1313
17. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572-1574
18. Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans (USA), 2010