

ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ВІДНОСИНИ ГОЛИХ АМЕБ ЗНАЙДЕНИХ У ПРИРОДНИХ БІОТОПАХ

М. ПАЦЮК

Житомирський державний університет імені Івана Франка, вул. В. Бердичівська, 40, Житомир, Україна

E-mail: kostivna@ukr.net

За допомогою морфологічних ознак та молекулярно-генетичних методів дослідження з природних біотопів нами ідентифіковано 24 види голих амеб. Послідовності гену 18S рРНК отримані для таких видів голих амеб: *Acanthamoeba proteus* isolate AP07 (ON907618), *Saccamoeba limax* isolate SLU_22 (OP894078), *Saccamoeba limax* isolate SL_Uk19 (OQ520144), *Saccamoeba* sp. strain IDL777 (MZ079370), *Thecamoeba striata* isolate THS19 (OQ134482), *Thecamoeba striata* isolate THS20 (OQ134483), *Thecamoeba similis* isolate Prut river (OL604177), *Thecamoeba similis* isolate Baggersee Innsbruck (Baggersee Rossau) (OL604178), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQD2 (ON398269), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQA1 (ON398268), *Thecamoeba* sp. strain THS203 (MZ079371), *Stenamoeba stenopodia* isolate UKSS7 (OP375108), *Stenamoeba stenopodia* isolate POLSS7 (OP419588), *Korotnevelia stella* isolate KSD2 (ON398267), *Korotnevelia stella* isolate KSA1 (ON398266), *Vexillifera bacillipedes* isolate river Dnepr (OK649262), *Vannella lata* isolate Kamenka river (OL305063), *Vannella lata* isolate Varta river (OL305064), *Vannella* sp. strain VLS303 (MZ079372), *Vannella simplex* isolate Black Sea (OM403052), *Vannella simplex* isolate Mediterranean Sea (OM403053), *Ripella* sp. strain RPL100 (MZ079369), *Mayorella vespertilio* isolate MV_7 (OP739500), *Mayorella* sp. isolate MY_7 (OP729930), *Acanthamoeba* sp. strain ATM123 (MZ079366), *Acanthamoeba* sp. isolate river Elbe (OK649261), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly01 (ON908497), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly15 (ON908496), *Acanthamoeba griffini* isolate Black sea (OM522832), *Acanthamoeba griffini* isolate Mediterranean Sea (OM522833), *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367), *Cochliopodium minus* isolate river Stokhid (OK649264), *Cochliopodium* sp. strain COP102 (MZ079368), *Vahlkampfia avara* isolate VA7 (OP179657), *Willaertia magna* isolate river Teterev (OK649263). На філогенетичному дереві, яке побудоване на основі гену 18S рРНК, усі види голих амеб знаходяться в межах *Acanthamoeba* й об'єднані в групи *Tubulinea* та *Discosea*. Окремо групуються види з прісних, морських водойм та наземних біотопів; по відношенню одна до одної такі групи видів є сестринськими

з низькими результатами бутстреп-аналізу, що свідчить про низьку достовірність віддаленості окремих видів амеб, виділених з різних природних біотопів.

Ключові слова: голі амеби, морфологія, ген 18S рРНК, філогенія, природні біотопи.

Вступ. Голі амеби найпоширеніша група протистів в морських і прісноводних водоймах, ґрунтах, деякі є ендопаразитами. Ці організми часто ізолюють із природних біотопів, однак, біорізноманіття їх майже невивчене. Для вирішення питання щодо особливостей поширення голих амеб необхідно проводити довготривалі дослідження, при цьому відбирати значну кількість проб з різних біотопів й враховувати той факт, що склад видів може змінюватися в різні сезони року. Такі дослідження мають особливу цінність, оскільки значна частина фауни амебоподібних організмів залишається невивченою й у пробах ми постійно виявляємо нові види.

Залишається відкритим питання й філогенії голих амеб, оскільки група включає таксони, які різняться за морфологічними ознаками. З'ясування філогенетичних зв'язків між видами голих амеб неможливе без проведення фауністичних робіт щодо вивчення різноманіття цих протистів. Опис нових видів дають змогу зрозуміти шляхи еволюції цієї групи гетеротрофних організмів. У багатьох роботах, які стосуються систематики голих амеб, останні визначені за морфологічними ознаками, які не відображають філогенетичної подібності (Leidy, 1879; Butschli, 1880–1882; Delage et al, 1896; Calkins, 1901; Penard, 1902). Опис та ідентифікація голих амеб – складний процес, потребує виділення протистів у культуру, застосування світлової та електронної мікроскопії. Відповідно, ідентифікація організму здійснюється на рівні штаму. В зв'язку з введенням в практику методів молекулярної генетики кількість ідентифікованих видів постійно зрос-

тає. Сьогодні опис нового виду, ідентифікація раніше описаних видів неможлива без аналізу морфологічних даних. Сучасне вивчення фауни голих амеб можливе лише в результаті комплексного дослідження, яке поєднує в собі як методи світлової мікроскопії, так і молекулярно-генетичні методи дослідження. Порівнюючи сьгоднішні дані з результатами раніше проведених досліджень ми можемо прослідкувати зміни в фауні голих амеб у добре вивченому біотопі, а також скласти її характеристику з використанням молекулярних даних. Крім того, молекулярно-генетичні методи дослідження дозволяють встановлювати зв'язки в межах групи Amoebozoa (Sims et al, 1999; Amaral Zettler et al, 2000).

Слід зазначити, що перші системи голих амеб, які показують філогенетичні відносини між різними групами цих протистів були розроблені групою вчених (Cavalier-Smith et al, 1998, 2004, 2009, 2016; Peglar et al, 2003; Tekle et al, 2008; Lahr et al, 2015). В основу цих систем покладені, як морфологічні так і молекулярні дані амебоподібних організмів. Крім голих амеб, у системах на філогенетичних деревах показані й інші представники протистів. У своїх роботах ми використовуємо сучасну систему голих амеб за (Cavalier-Smith et al, 2016).

Метою нашої роботи є встановити філогенетичні відносини між різними видами голих амеб, виділених нами з різних природних біотопів впродовж 2013–2022 рр. під час комплексних досліджень фауни цих протистів.

Методи. Використані в роботі екземпляри голих амеб були виділені з проб, які відібрані з прісних водойм України, Польщі, Чехії, Німеччини, Австрії, Швейцарії. Усього вивчено більше 1000 проб, з яких отримано близько 500 культур амеб. Спеціалісти надають перевагу працювати не з природним матеріалом, а з лабораторними штамами амеб. 5 мл проби рівномірно розподіляли в чашці Петрі діаметром 100 мм з непоживним агар-агаром (non-nutrient agar (NNA)) за методикою Пейджа з додаванням зерен рису (Page, 1988). Амеб підтримували в культурах у лабораторних умовах при температурі +20 °C та при нерегулюючому освітленні. Кожну чашку з пробією розглядали один раз у вісім днів за допомогою світлового

мікроскопа «Ломо МБР-3». Для встановлення видової приналежності амеб відбирали по одній клітині з кожної чашки довгою піпеткою Пастера в чашки Петрі діаметром 50 мм з 1,5%-вим непоживним агар-агаром (NNA) (Page, 1988), який готували на мінеральному середовищі Прескота-Джеймса (PJ) і знову розмножували. Мінеральне середовище Прескота-Джеймса має наступний склад (Page, 1988): приготувати три основні розчини (кожен розбавити в 100 мл води).

Основний розчин А

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,433 g

KCl 0,162 g

Основний розчин В

K_2HPO_4 0,512 g

Основний розчин С

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,280 g

По 1 мл кожного вихідного розчину змішують із 997 мл дистильованої води.

Ідентифікацію видів здійснювали за допомогою світлового мікроскопу Axio Image M1 (Центр колективного користування науковими приладами «Animalia» Інституту зоології ім. І.І. Шмальгаузена) із застосуванням диференційного інтерференційного контрасту, відсаджуючи живі клітини в краплі води на предметні скельця. Основними морфологічними ознаками були розміри локомоторних форм (ширина клітини (В) – відстань, яка вимірюється перпендикулярно напрямку руху в найбільш ширшій частині клітини; довжина клітини (L) – відстань між переднім та заднім кінцем рухомої клітини; співвідношення довжини до ширини клітини (L/V)), діаметр ядра та цисти (Page and Siemensma, 1991). Проміри здійснювали на інтактних клітинах або за мікрофотографіями. Вимірювали не менше 50 амеб із кожного штаму. Ядра вимірювали в 50 амеб з кожного штаму. Вимірювання клітин проводили за допомогою окуляр-мікромметра (×40).

При визначенні голих амеб використовували традиційні для цієї групи ознаки: морфологія локомоторної форми з урахуванням морфотипу, морфологія уроїду, псевдоподій, характер руху цитоплазми, утворення флотуючої форми (Page, 1983; Page and Siemensma, 1991).

Виділення ДНК. У більшості амеб не вдається виділити ДНК, оскільки в культурах амеб, окрім останніх, містяться ще й інші еукаріоти (наприклад, гриби, твариноподібні організми), які є харчовими об'єктами амеб. Тому, перед виділенням ДНК амеб витримували на голодному агар-агарі для очистки їх від інших еукаріотичних контамінантів. Геномна ДНК була виділена за допомогою гуанідин-ізоціанат-

ного методу (Maniatis et al, 1982). Ген 18S рРНК ампліфікували з використанням універсальних еукаріотичних праймерів RibA 5'-AC-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3' та RibB 5'-T-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' (Medlin et al, 1988). Для кожного виду використовували одні й ті ж праймери для секвенування. Порівняння отриманих послідовностей ДНК (таблиця) із даними ГенБанку (GenBank) прово-

Таблиця 1. Послідовності гену 18S рРНК голих амеб, виділених з природних біотопів

Вид амеб	Місце знаходження/біотоп	Секвенси досліджуваних зразків ДНК у Genbank
<i>Amoeba proteus</i> isolate AP07	р. Стохід, Волинська область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	ON907618
<i>Saccamoeba limax</i> isolate SLU_22	р. Стохід, Ковельський район, Волинська область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP894078
<i>Saccamoeba limax</i> isolate SL_Uk19	Женевське озеро, Швейцарія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OQ520144
<i>Saccamoeba</i> sp. strain IDL777	р. Тетерів, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079370
<i>Thecamoeba striata</i> isolate THS19	р. Кам'янка, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OQ134482
<i>Thecamoeba striata</i> isolate THS20	Женевське озеро, Швейцарія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OQ134483
<i>Thecamoeba similis</i> isolate Prut river	р. Прут, м. Чернівці, Чернівецька область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OL604177
<i>Thecamoeba similis</i> isolate Baggersee Innsbruck (Baggersee Rossau)	озеро Багер (Baggersee Innsbruck (Baggersee Rossau)), Австрія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OL604178
<i>Thecamoeba quadrilineata</i> isolate THQD2	р. Дніпро, Запорізька область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	ON398269
<i>Thecamoeba quadrilineata</i> isolate THQA1	водойма поблизу м. Феклабрук (нім. Vöcklabruck), Австрія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	ON398268
<i>Thecamoeba</i> sp. strain THS203	р. Тетерів, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079371
<i>Stenamoeba stenopodia</i> isolate UKSS7	р. Гуйва, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP375108
<i>Stenamoeba stenopodia</i> isolate POLSS7	р. Варта, м. Познань, Польща/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP419588
<i>Korotnevella stella</i> isolate KSD2	р. Дніпро, Херсонська область/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	ON398267
<i>Korotnevella stella</i> isolate KSA1	оз. Багер, Австрія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	ON398266
<i>Vexillifera bacillipedes</i> isolate river Dnepr	р. Дніпро, Запорізька область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OK649262

Вид амеб	Місце знаходження/біотип	Секвенс досліджуваних зразків ДНК у Genbank
<i>Vannella lata</i> isolate Kamenka river	р. Кам'янка, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OL305063
<i>Vannella lata</i> isolate Varta river	р. Варта поблизу м. Познань, Польща/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OL305064
<i>Vannella</i> sp. strain VLS303	р. Тетерів, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079372
<i>Vannella simplex</i> isolate Black Sea	Чорне море, Одеса, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OM403052
<i>Vannella simplex</i> isolate Mediterranean Sea	Середземне море, Сіде, Турція/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OM403053
<i>Ripella</i> sp. strain RPL100	р. Гуйва, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079369
<i>Mayorella vespertilioides</i> isolate MV_7	р. Кам'янка, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP739500
<i>Mayorella</i> sp. isolate MY_7	заплавна водойма, Вінницька область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP729930
<i>Acanthamoeba</i> sp. strain ATM123	р. Гуйва, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079366
<i>Acanthamoeba</i> sp. isolate river Elbe	р. Ельба біля м. Усті-над-Лабем, Чехія/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OK649261
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> isolate AcPoly01	мох, Житомирська область, Україна	ON908497
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> isolate AcPoly15	мох, Польща	ON908496
<i>Acanthamoeba griffini</i> isolate Black sea	Чорне море, Одеса, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OM522832
<i>Acanthamoeba griffini</i> isolate Mediterranean Sea	Середземне море, Сіде, Турція/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OM522833
<i>Cochliopodium actinophorum</i> strain COP101	р. Кам'янка, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079367
<i>Cochliopodium minus</i> isolate river Stokhid	р. Стохід, Ковельський район, Волинська область, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OK649264
<i>Cochliopodium</i> sp. strain COP102	р. Тетерів, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	MZ079368
<i>Vahlkampfia avara</i> isolate VA7	р. Кам'янка, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OP179657
<i>Willaertia magna</i> isolate river Teteriv	р. Тетерів, м. Житомир, Україна/поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води	OK649263

дилось за допомогою програми BLAST (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Отримані послідовності були автоматично вирівняні з використанням алгоритму Muscle, реалізованого у програмі MEGA 10.0. На основі вирівнювання, який складається з послідовностей гену 18S рРНК для представників родів *Amoe-*

ba Bory de St. Vincent, 1822, *Saccamoeba* Bovee, 1972, *Cochliopodium* Hertwig and Lesser, 1874, *Mayorella* Schaeffer, 1926, *Vannella* Bovee, 1965, *Vexillifera* Schaeffer, 1926, *Korotnevella* Goodkov, 1988, *Stenamoeba* Smirnov et al, 2007, *Thecamoeba* Fromentel, 1874, *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931, *Vahlkampfia* Chatton and Lalung-Bonnaire, 1912,

Willaertia de Jonckheere et al, 1984 був проведений філогенетичний аналіз за допомогою програми MEGA 10.0 (Kumar et al, 2018). Для філогенетичного аналізу були використані як одержані нами секвенси, так і секвенси інших видів голих амеб, які доступні в базі даних GenBank. Філогенетичний аналіз виконаний методом максимальної правдоподібності за алгоритмом Neighbor-Joining у програмі MEGA 10.0. Достовірність побудованих дендрограм оцінювалась за допомогою бутстреп-аналізу (1000).

Результати. У результаті проведених досліджень з 2013 по 2022 рр. з прісних водойм нами виділено 44 види голих амеб, із ґрунтів – 23 види, за допомогою молекулярно-генетичних методів дослідження ідентифіковано 24 види. Послідовності гену 18S рРНК голих амеб, виділених з природних біотопів наведені в таблиці. Усі секвенси, отримані впродовж наших досліджень, порівняні із спорідненими секвенсами голих амеб із ГенБанку за SSU рДНК (рис. 1–5).

Філогенетичний аналіз показує, що секвенс виду *Amoeba proteus* isolate AP07 (ON907618, р. Стохід) надійно групується з секвенсом виду *Amoeba proteus* strain Geneva, депонованого з ГенБанку (AJ314604), яка була знайдена в водоймах Женеві (Швейцарія). Сестринським є вид *Chaos carolinense* clone JG10.98 (JQ519502). У другій групі секвенсів виділяються невизначені види роду *Saccamoeba* (*Saccamoeba* sp. strain IDL777 (MZ079370, р. Тетерів) та *Saccamoeba* sp. SC007 (AY549565)) з низьким результатом бутстреп-аналізу. *Saccamoeba limax* isolate SLU_22 (OP894078), яка виділена нами з р. Стохід Волинської області добре групується з *Saccamoeba limax*, секвенс досліджуваного зразка ДНК якої в ГенБанку AF293902 з порівняно високим значенням бутстреп-аналізу. Сестринським по відношенню до цієї групи амеб є представник з родини Hartmannellidae Volkonsky, 1931 (*Hartmannellidae* sp. LOS7N/I (AY145442)) з низьким результатом бутстреп-аналізу. На філогенетичному дереві представлені види голих амеб, які виділені з прісних водойм (рис. 1).

Дев'ять різних секвенсів голих амеб з родів *Thecamoeba* та *Stenamoeba*, отримані протягом наших досліджень, порівняні з п'ятьма спорідненими секвенсами з ГенБанку за SSU рДНК

(рис. 2). Аналіз фрагмента філогенетичного дерева показує три групи *Thecamoeba*-подібних амеб та одну групу *Stenamoeba*-подібних амеб. Перша група включає секвенси видів *Thecamoeba* sp. ATCC PRA-35 (EF455775), *Thecamoeba striata* isolate THS19 (OQ134482), виділеної з р. Кам'янка м. Житомира та *Thecamoeba striata* isolate THS20 (OQ134483), виділеної з Женевського озера, Швейцарія. Останній вид надійно групується з вище зазначеними. Сестринським видом по відношенню до цієї групи амеб є *Thecamoeba* sp. THS203 (MZ079371), яка знайдена нами в р. Тетерів поблизу м. Житомира. У другу групу включені секвенси видів *Thecamoeba similis* isolate Prut river (OL604177) і *Thecamoeba similis* isolate Baggersee Innsbruck (OL604178), які виділені нами з р. Прут, м. Чернівці та озера Багер, Австрія відповідно. Сестринським є секвенс виду *Thecamoeba similis* strain UKNCC:CCAP1583/8 (секвенс досліджуваного зразка ДНК в ГенБанку JQ271722). Перші два види в філогенетичному аналізі подібні на 99 %, із третім видом – на 58 %. У третю групу входять секвенси голих амеб *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQD2 (ON398269) та *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQA1 (ON398268), які знайдені нами у р. Дніпро Запорізької області та заплавної водоймі поблизу м. Феклабрук, Австрія відповідно. Вони групуються з низьким значенням бутстреп-аналізу. Сестринським є вид *Thecamoeba quadrilineata*, секвенс досліджуваного зразка ДНК якої в ГенБанку DQ122381. У цій групі вона має високе значення бутстреп-аналізу. У четвертій групі опинилися секвенси представників роду *Stenamoeba* (OP375108, AY294144, OP419588), які надійно між собою групуються (рис. 2). Усі види голих амеб, які представлені на філогенетичному дереві відомі з прісних водойм.

З рис. 3 видно, що усі секвенси голих амеб з роду *Korotnevella* (AY183893, OM407395, ON398266, AY686573, ON398267) об'єднуються в одну групу та між собою групується з високими значеннями бутстреп-аналізу (90–98 %). Сестринською по відношенню до коротневел є група вексіліфероподібних амеб, які відомі з р. Дніпро Запорізької області (OK649262) та з водойм Чехії (HQ687484), які відносно надійно групується між собою. В іншій групі групується секвенси морських та

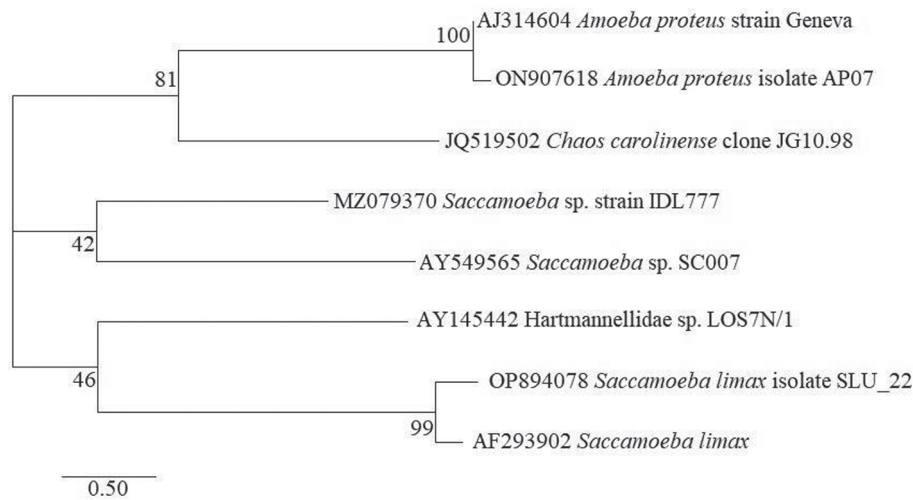


Рис. 1. Фрагмент філогенетичного дерева, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників родів *Амоeba* та *Сaccamoeba*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

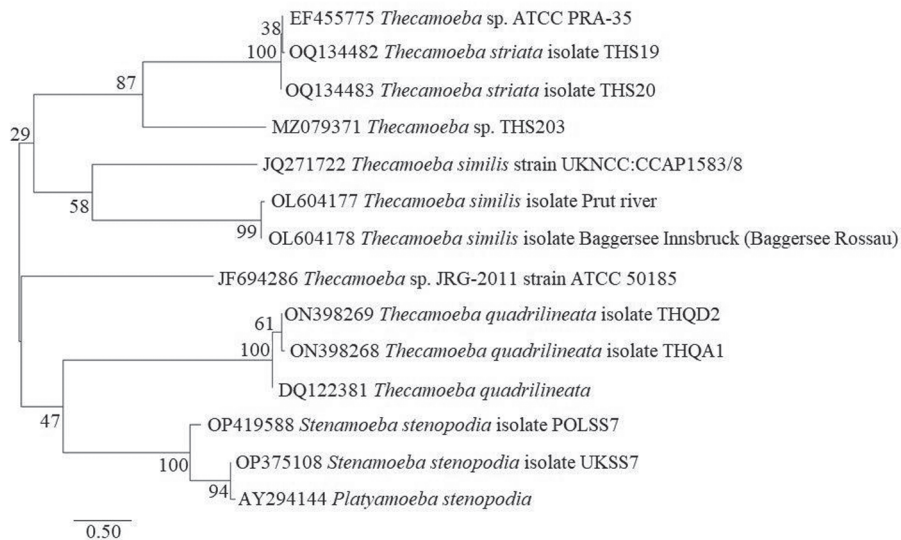


Рис. 2. Фрагмент філогенетичного дерева, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників родів *Thecamoeba* та *Stenamoeba*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

прісноводних голих амеб з роду *Vannella*. *Vannella lata* isolate Кам'янка river (OL305063) з р. Кам'янка поблизу м. Житомира подібна з *Vannella lata* на 62 %, секвенс досліджуваного зразку ДНК якої у ГенБанк AF464917, ці амеби надійно групуються з *Vannella lata* isolate Varta river (OL305064), виділеної нами з р. Варта поблизу м. Познань, Польща (98 %). Ці прісноводні амеби утворюють сестринську групу з морськими видами (*Vannella simplex* isolate Black Sea (OM403052), *Vannella simplex* isolate

Mediterranean Sea (OM403053), *Vannella simplex* (AF464914)).

Acanthamoeba griffini isolate Mediterranean Sea (OM522833), яка виділена з Середземного моря групується з *Acanthamoeba griffini* isolate B18 (GU553135), виділеної з гарячих джерел з порівняно високим результатом бутстреп-аналізу (86 %). *Acanthamoeba griffini* isolate Black sea (OM522832) з Чорного моря подібна до вищезгаданих амеб на 66 % (рис. 4). До цієї групи амеб сестринським є вид *Acanthamoeba*

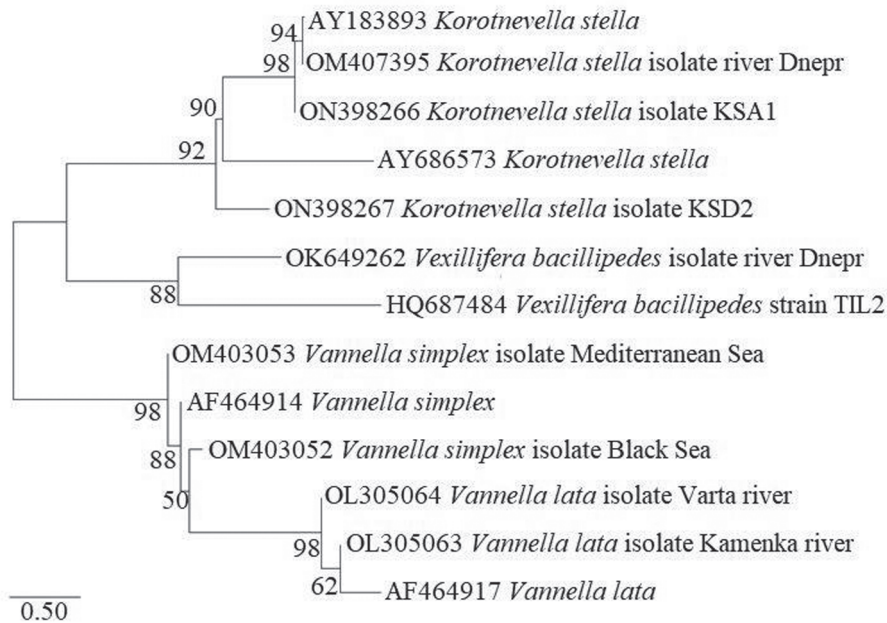


Рис. 3. Фрагмент філогенетичного дерева, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників родів *Korotnevella*, *Vexillifera*, *Vannella*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

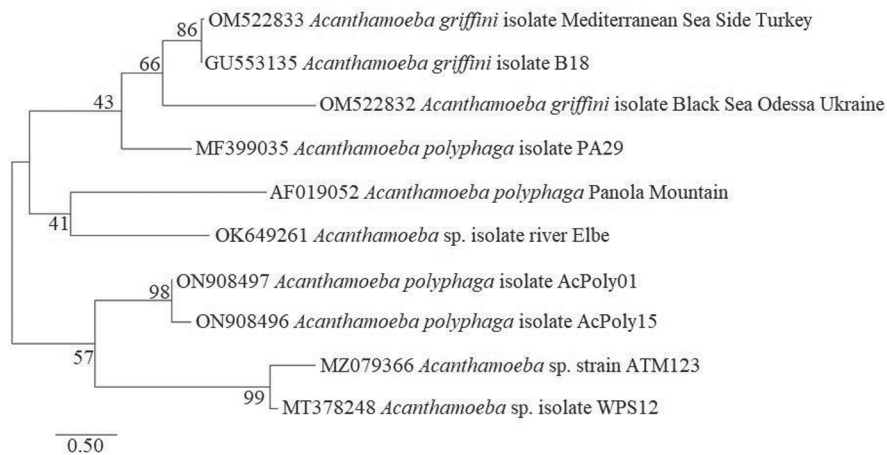


Рис. 4. Фрагмент філогенетичного дерева, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників роду *Acanthamoeba*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

polyphaga isolate PA29 (MF399035 з стічних вод Іспанії) (подібність складає 43 %). Секвенс амеби *Acanthamoeba* sp. isolate river Elbe (OK649261), яка ізольована нами з р. Ельба (Чехія) з низьким результатом бутстреп-аналізу групується з амебою *Acanthamoeba polyphaga* Panola Mountain (AF019052), відомої з гори Панола. В окрему групу входять секвенси *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly01 (ON908497) з мохів

України та *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly15 (ON908496), яка знайдена в мохах Польщі. Надійність групи складає 98 %. Сестринською є група секвенсів акантамеб *Acanthamoeba* sp. strain ATM123 та *Acanthamoeba* sp. isolate WPS12 (MZ079366 й MT378248) (рис. 4).

Представники роду *Cochliopodium* на філогенетичному дереві утворюють окрему різно-рідну групу – містить різні види (*Cochliopodi-*

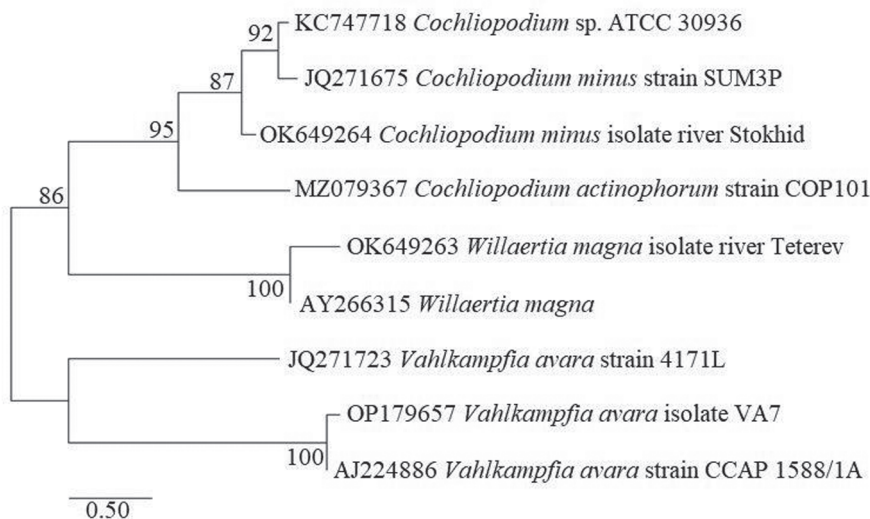


Рис. 5. Фрагмент філогенетичного дерева, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників родів *Cochliopodium*, *Vahlkampfia*, *Willaertia*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

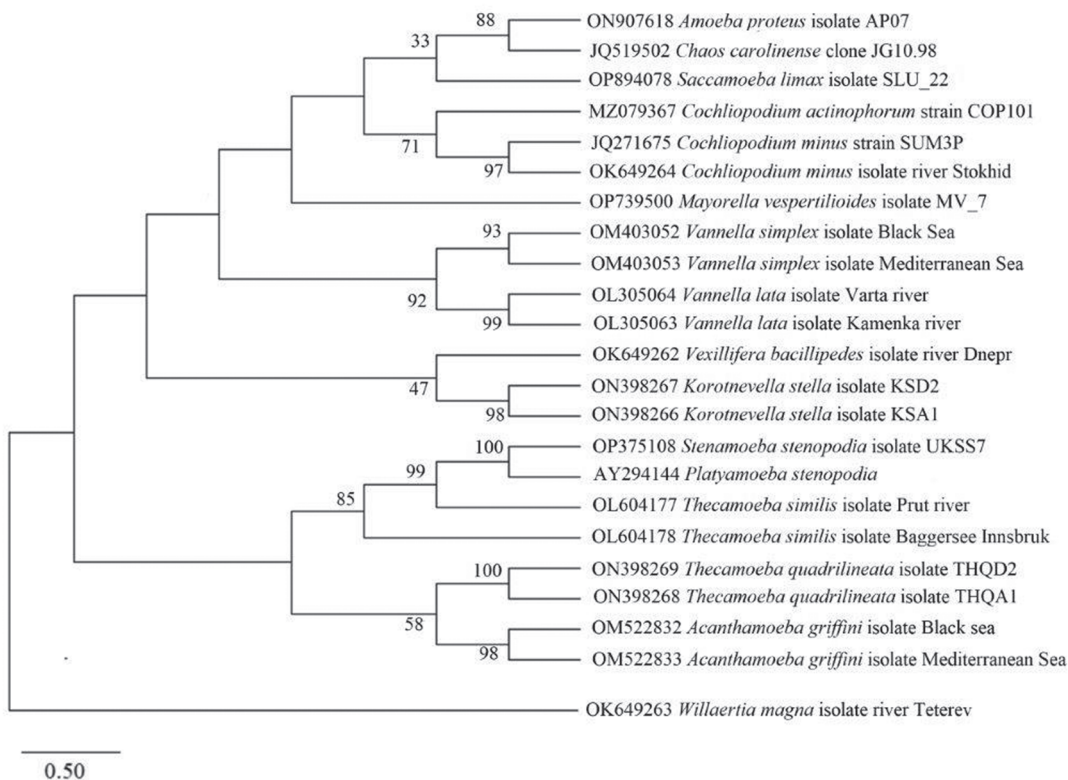


Рис. 6. Філогенетичне дерево, яке побудоване на основі секвенсів гену 18S рРНК для представників голих амеб груп Tubulinea та Discosea. Аутгрупа – гетеролобозна амеба *W. magna*. Шкала масштабу показує еквівалентність відстані між послідовностями

um sp. ATCC 30936 (KC747718), *Cochliopodium minus* isolate river Stokhid (OK649264), *Cochliopodium minus* strain SUM3P (JQ271675), *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367)).

Групуються ці види між собою з надійною підтримкою (від 87 до 95 %) (рис. 5). *Cochliopodium minus* isolate river Stokhid (OK649264), виділеної нами з р. Стохід Волинської області відносно надійного групується з *Cochliopodium* sp. ATCC 30936 (KC747718) та *Cochliopodium minus* strain SUM3P (JQ271675). *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367) з р. Кам'янка (Україна) є сестринським по відношенню до групи вищезгаданих амеб (95 %). Що стосується гетеролобозних амеб, то представники роду *Willartia* групуються з представниками роду *Vahlkampfia* (рис. 5). Усі види голих амеб на філогенетичному дереві є прісноводними.

Нами побудоване філогенетичне дерево різних видів голих амеб, виділених з природних біотопів (рис. 6). Аутгрупою вибрано гетеролобозну амебу *Willartia magna* isolate river Teteriv (OK649263). З рис. 6 видно, що *Amoeba proteus* isolate AP07 (ON907618) та *Chaos carolinense* clone JG10.98 (JQ519502) утворюють групу з порівняно високим значенням бутстреп-аналізу (88 %), сестринським є вид *Saccamoeba limax* isolate SLU_22 (OP894078) з низьким значенням (33 %). Ці протисти належать до політактичного та моноподіального морфотипів й входять в групу Tubilinea. Остання включає голих амеб з циліндричними, іноді сплюснутими псевдоподіями, моноаксиальним током цитоплазми, без глікостилей та лусочок (Dykova et al, 2008; Cavalier-Smith et al, 2016; Anderson, 2018). У цю групу ввійшли прісноводні види голих амеб. Далі на філогенетичному дереві групуються амеби з групи Discosea – сплюснені амеби, які не утворюють трубчасті псевдоподії, з поліаксиальним током цитоплазми, є глікостилі та органічні лусочки (Dykova et al, 2008; Corsaro et al, 2013; Cavalier-Smith et al, 2016; Anderson, 2018). У цій кладі об'єднуються види, які відомі з прісних, морських водойм та наземних біотопів. Окремою є група амеб з роду *Cochliopodium*, які належать до лінзоподібного морфотипу: *Cochliopodium minus* strain SUM3P (JQ271675) з водойм Чехії надійно групується з *Cochliopodium minus* isolate river Stokhid (OK649264) з р. Стохід Волинської області, сестринським є вид *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367) з р. Кам'янка поблизу м. Житомира (подібність складає 71 %). Окремою гілкою є *Mayorella vespertilioi-*

des isolate MV_7 (OP739500) з р. Кам'янка (м. Житомир). Вид належать до майорельного морфотипу. Прісноводні в'ялоподібні амеби (*Vannella lata* isolate Kamenka river (OL305063) + *Vannella lata* isolate Varta river (OL305064)) та морські (*Vannella simplex* isolate Mediterranean Sea (OM403053)+*Vannella simplex* isolate Black Sea (OM403052)) на філогенетичному дереві входять у різні групи, які є сестринськими по відношенню одна до одної. *Korotnevelia stella* isolate KSD2 (ON398267) з р. Дніпро надійно групується з *Korotnevelia stella* isolate KSA1 (ON398266) з оз. Багер, Австрія. Сестринським є вид *Vexillifera bacillipedes* isolate river Dnepr (OK649262) з р. Дніпро (подібність складає 47 %). Згадані види належать до дактилоподіального морфотипу. Представники роду *Stenamoeba* добре групуються з амебами з роду *Thecamoeba* (85–99 %).

Надійна група представників морських акантамеб (OM522832 та OM522833), які виділені нами з Чорного та Середземного морів з низькою подібністю (58 %) групується з *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQD2 (ON398269) та *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQA1 (ON398268), які виділені нами з р. Дніпро Запорізької області та водойми поблизу м. Феклабрук, Австрія відповідно.

Обговорення. Виділення достатньої кількості голих амеб з природних біотопів, їх морфологічна та молекулярно-генетична характеристика залишається основним завданням, яке необхідне для уточнення таксономічного та філогенетичного положення більшості видів цих протистів. Нами секвеновано ген 18S рРНК для 24 видів голих амеб. На основі одержаних послідовностей гену 18S рРНК та послідовностей споріднених видів голих амеб, депонованих з ГенБанку, проаналізовано філогенетичні відносини між різними видами, які виділені з прісних і морських водойм та наземних біотопів.

В літературі вказано, що види голих амеб родини Amoebidae Ehrenberg, 1838 хоча і вважаються найбільш поширеною групою протистів, однак відмічаються одиничні знахідки представників родів *Amoeba* Bory de Saint-Vincent, 1822, *Polychaos* Schaeffer, 1926, *Deuteroamoeba* Page, 1987, *Chaos* Linnaeus, 1767, *Trichamoeba* Fromentel, 1874, *Hydramoeba* Reynolds

and Loope, 1928, *Parachaos* Willumsen, Siemensma and Suhr-Jessen, 1987 (Willumsen, 1982; Page and Robson, 1983; Bolivar et al, 2001; Mrgva, 2010/2011). Така закономірність прослідковується й в наших дослідженнях, вид *Amoeba proteus* isolate AP07 траплялася нами лише декілька раз у пробах, відібраних з р. Стохід (Волинська область, Україна). Для представників Amoebidae була побудована невелика кількість повних філогенетичних дерев на основі послідовностей гену 18S рРНК. Вперше види з родів *Amoeba* (у т.ч. *A. proteus*) та *Chaos* були секвеновані І. Боліваром (Bolivar et al, 2001) й на основі секвенсів побудовані філогенетичні дерева, з яких видно, що вони утворюють стійку кладу. Мультигенні дані по *A. proteus* були наведені в роботі Д. Лара (Lahr et al, 2013). На цьому дереві немає інших представників родини. Представники родів *Amoeba* та *Chaos* на філогенетичних деревах, побудованих за геном 18S рРНК, групуються з представниками *Saccamoeba* та *Hartmannella* з високими значеннями бутстреп-аналізу (Bolivar et al, 2001; Corsaro et al, 2010; Dykova et al, 2008). На цих деревах представлені види аміб, виділені з різних місцезнаходжень. Проведений нами філогенетичний аналіз на основі гену 18S рРНК розмістив *Amoeba proteus* isolate AP07 (AJ314604) й *Amoeba proteus* strain Geneva (ON907618) у сестринську групу з *Chaos carolinense* JG 10.98 (JQ519502), що підтверджує його положення, яке встановлене раніше (Bolivar et al, 2001). Наші дані також підтверджують зв'язок між двома родинами Amoebidae та Hartmannellidae (*Saccamoeba* + *Hartmannella*), хоча з низькими результатами бутстреп-аналізу (рис. 1).

Родина Thecamoebidae містить морфологічно гетерогенні аміби. Відомо, що представники роду *Thecamoeba* на філогенетичних деревах, побудованих за геном 18S рРНК, утворюють стійку кладу (Pawlowski and Burki, 2009). *S. stenopodia* (раніше *Platyamoeba stenopodia* Page, 1969) групується з *Thecamoeba/Sappinia* (Brown et al, 2007; Pawlowski and Burki, 2009). Це підтверджують й наші дослідження. На рис. 2 видно, що окремими групами об'єднуються різні види *Thecamoeba*-подібних та *Stenamoeba*-подібних аміб (стріатного та язикоподібного морфотипів відповідно), виділених з різних прісних водойм.

Vannella + *Korotnevella* + *Vexillifera* – звичайна відносно стабільна кладка на філогенетичних деревах, представники якої можуть групуватися з високими значеннями бутстреп-аналізу (Cavalier-Smith et al, 2004; Teckle et al, 2008). Вважають, що *Vannella*-подібні аміби є найпоширенішими серед усіх голих аміб і на філогенетичних деревах, побудованих на основі гену 18S рРНК, об'єднуються в окремі групи (з прісних та морських водойм) з високими значеннями бутстреп-аналізу (Dykova et al, 2005). За нашими даними аміби родів *Korotnevella* та *Vexillifera* (відносяться до дактилоподіального морфотипу) на філогенетичному дереві об'єднуються окремо (рис. 3) з високими значеннями бутстреп-аналізу (90–98 та 88 % відповідно). У першу групу входять прісноводні види аміб з роду *Korotnevella*, у другу – з роду *Vexillifera*. Що стосується в'ялоподібних аміб, то представники роду *Vannella* на філогенетичному дереві утворюють дві окремі відносно стійкі групи голих аміб – із прісних та солоних водойм (рис. 3).

Acanthapodida + Balamuthia єдина кладка, яка сильно підтримується в усіх типах аналізу, була включена в групу Variosea, однак цей зв'язок не підтримується на різних деревах на основі SSU rDNA (Cavalier-Smith et al, 2004; Pawlowski and Barki, 2009). З рис. 4 видно, що акантоподіальні аміби утворюють окремі стійкі групи видів з морських водойм, прісних водойм та наземних біотопів. Проте, ці групи аміб по відношенню одна до одної на філогенетичному дереві є нестабільними.

Що стосується роду *Cochliopodium*, то представники таксону на філогенетичних деревах утворюють відносно окрему гілку, яка немає чітких відносин з будь-якою стійкою кладою амібоподібних (Tekle et al, 2008; Cole et al, 2010). На рис. 5 представлена стійка група лінзоподібних прісноводних аміб з роду *Cochliopodium*. *Willaertia* + *Vahlkampfia* + *Naegleria*, які відносяться до гетеролобозних аміб, у філогенетичному відношенні добре групуються й на деревах утворюють окремі кладки (Brown et al, 1999; Bass et al, 2016). За нашими даними на філогенетичному дереві надійно групуються прісноводні види роду *Willaertia* та окремо – роду *Vahlkampfia*.

Висновки. Наші дослідження показують, що різноманітність голих амеб, виділених з водних та наземних біотопів є недослідженим. Найбільша кількість видів виділена з прісних водойм. Дослідження цієї групи протистів з використанням послідовностей гену 18S рРНК та морфологічні дані дають змогу ідентифікувати більшу кількість видів. За допомогою морфологічних та молекулярних досліджень нами ідентифіковано 24 види голих амеб, секвенс досліджуваних зразків ДНК яких депоновані у ГенБанк. Це такі види: *Ameoba proteus* isolate AP07 (ON907618), *Saccamoeba limax* isolate SLU_22 (OP894078), *Saccamoeba limax* isolate SL_Uk19 (OQ520144), *Saccamoeba* sp. strain IDL777 (MZ079370), *Thecamoeba striata* isolate THS19 (OQ134482), *Thecamoeba striata* isolate THS20 (OQ134483), *Thecamoeba similis* isolate Prut river (OL604177), *Thecamoeba similis* isolate Baggersee Innsbruck (Baggersee Rossau) (OL604178), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQD2 (ON398269), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQA1 (ON398268), *Thecamoeba* sp. strain THS203 (MZ079371), *Stenamoeba stenopodia* isolate UKSS7 (OP375108), *Stenamoeba stenopodia* isolate POLSS7 (OP419588), *Korotnevela stella* isolate KSD2 (ON398267), *Korotnevela stella* isolate KSA1 (ON398266), *Vexillifera bacillipedes* isolate river Dnepr (OK649262), *Vannella lata* isolate Kamenka river (OL305063), *Vannella lata* isolate Varta river (OL305064), *Vannella* sp. strain VLS303 (MZ079372), *Vannella simplex* isolate Black Sea (OM403052), *Vannella simplex* isolate Mediterranean Sea (OM403053), *Ripella* sp. strain RPL100 (MZ079369), *Mayorella vespertilioides* isolate MV_7 (OP739500), *Mayorella* sp. isolate MY_7 (OP729930), *Acanthamoeba* sp. strain ATM123 (MZ079366), *Acanthamoeba* sp. isolate river Elbe (OK649261), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly01 (ON908497), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly15 (ON908496), *Acanthamoeba griffini* isolate Black sea (OM522832), *Acanthamoeba griffini* isolate Mediterranean Sea (OM522833), *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367), *Cochliopodium minus* isolate river Stokhid (OK649264), *Cochliopodium* sp. strain COP102 (MZ079368), *Vahlkampfia avara* isolate VA7 (OP179657), *Willaertia magna* isolate river Teterev (OK649263). Для встановлення філогенетичних зв'язків між різними видами голих

амеб, виділених з прісних та морських водойм, наземних біотопів ми використовували послідовності гену 18S рРНК цих організмів. На філогенетичних деревах вони групуються окремо й є сестринськими по відношенню одна до одної з низькими значеннями бутстреп-аналізу, що свідчить про низьку достовірність віддаленості окремих груп голих амеб. Віялоподібні амеби, виділені з морських водойм *Vannella simplex* isolate Mediterranean Sea (OM403053), *Vannella simplex* (AF464914), *Vannella simplex* isolate Black Sea (OM403052) на філогенетичному дереві утворюють окрему групу; з низьким значенням бутстреп-аналізу групуються з прісноводними *Vannella*-подібними амебами. *Acanthamoeba griffini* isolate Mediterranean Sea (OM522833), *Acanthamoeba griffini* isolate B18 (GU553135), *Acanthamoeba griffini* isolate Black sea (OM522832) відомі з морських водойм об'єднуються в окрему групу й з низьким значенням бутстреп-аналізу групуються з прісноводними акантамебами. Амеби, виділені з наземних біотопів (епіфітні мохи) *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly01 (ON908497) та *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly15 (ON908496) на філогенетичному дереві надійно між собою групуються та є сестринськими по відношенню до прісноводних представників роду *Acanthamoeba* з низьким значенням бутстреп-аналізу. Наші дослідження показують, що в цілому голі амеби на філогенетичних деревах відповідають раніше встановленим системам, в яких враховані як морфологічні, так і генетичні ознаки цих протистів.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF NAKED AMOEBAS, FOUND IN NATURAL BIOTOPES

M. Patsiuk

Ivan Franko Zhytomyr State University
40, Velyka Berdychivska Str., Zhytomyr, Ukraine

E-mail: kostivna@ukr.net

Using morphological traits and molecular-genetic research methods, we identified 24 species of naked amoeba from natural biotopes. The sequences of gene 18S rRNA were obtained for the following naked amoeba: *Amoeba proteus* isolate AP07 (ON907618), *Saccamoeba limax* isolate SLU_22 (OP894078), *Saccamoeba limax* isolate SL_Uk19 (OQ520144), *Saccamoeba* sp. strain IDL777 (MZ079370), *Thecamoeba striata* isolate THS19 (OQ134482), *Thecamoeba striata* isolate THS20 (OQ134483), *Thecamoeba similis* isolate from the Prut river (OL604177), *Thecamoeba similis* isolate from Baggersee Innsbruck (Baggersee Rossau) (OL604178), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQD2 (ON398269), *Thecamoeba quadrilineata* isolate THQA1 (ON398268), *Thecamoeba* sp. strain THS203 (MZ079371), *Stenamoeba stenopodia* isolate UKSS7 (OP375108), *Stenamoeba stenopodia* isolate POLSS7 (OP419588), *Korotnevella stella* isolate KSD2 (ON398267), *Korotnevella stella* isolate KSA1 (ON398266), *Vexillifera bacillipedes* isolate from the Dnieper river (OK649262), *Vannella lata* isolate from the Kamenka river (OL305063), *Vannella lata* isolate from the Varta river (OL305064), *Vannella* sp. strain VLS303 (MZ079372), *Vannella simplex* isolate from the Black Sea (OM403052), *Vannella simplex* isolate from the Mediterranean Sea (OM403053), *Ripella* sp. strain RPL100 (MZ079369), *Mayorella vespertilioides* isolate MV_7 (OP739500), *Mayorella* sp. isolate MY_7 (OP729930), *Acanthamoeba* sp. strain ATM123 (MZ079366), *Acanthamoeba* sp. isolate from the Elbe river (OK649261), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly01 (ON908497), *Acanthamoeba polyphaga* isolate AcPoly15 (ON908496), *Acanthamoeba griffini* isolate from the Black sea (OM522832), *Acanthamoeba griffini* isolate from the Mediterranean Sea (OM522833), *Cochliopodium actinophorum* strain COP101 (MZ079367), *Cochliopodium minus* isolate from the Stokhid river (OK649264), *Cochliopodium* sp. strain COP102 (MZ079368), *Vahlkampfia avara* isolate VA7 (OP179657), *Willaertia magna* isolate from the Teteriv river (OK649263). All the species of naked amoeba in the phylogenetic tree, built using gene 18S rRNA, are within Amoebozoa, united into groups Tubulinea and Discosea. There are separate groups of freshwater, sea and land biotopes; these groups are sister species with low results of bootstrap analysis, which demonstrates low probability of remoteness of some amoeba species, found in different natural biotopes.

REFERENCES

Amaral Zettler LA, Nerad TA, O'Kelly CJ, Peglar MT, Gillevet PM, Silberman JD, Sogin ML (2000) A Molecular Reassessment of the Leptomyxid Amoebozoa. *Protist* 151:275–282. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00025>

- Anderson OR (2018) A Half-century of Research on Free-living Amoebozoa (1965–2017): Review of Biogeographic, Ecological and Physiological Studies. *Acta Protozoologica* 57(1):1–28. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.18.001.8395>
- Bass D, Silberman JD, Brown MW, Tice AK, Jousset A, Geisen S, Hartikainen H (2016) Coprophilic amoebae and flagellates, including *Guttulinopsis*, *Rosculus* and *Helkesimastix*, characterise a divergent and diverse rhizarian radiation and contribute to a large diversity of faecal-associated protists. *Environ Microbiol* 18:1604–1619. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13235>
- Bolivar I, Fahrmi JF, Smirnov A, Pawlowski J (2001) SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Mol Biol Evol* 18:2306–2314. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003777>
- Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2007) Amoeba at attention: phylogenetic affinity of *Sappinia pedata*. *J Eukaryot Microbiol* 54:511–519. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00292.x>
- Brown S, Jonckheere JF (1999) A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSUrDNA sequences. *Europ J Protistol* 35(1):49–54. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(99\)80021-2](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(99)80021-2)
- Bytschli O Protozoa Mit einem Beitrag: Palaeontologische Entwicklung der Rhizopoda, von C. Schwager/H.G. Bronn (ed.) Die Klassen und Ordnungen des Thierreichs, wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild: Winter'sche Verlagshandlung (Leipzig), 3 volumes: Volume 1. 1880–1882, Abtheilung: Sarkodina und Sporozoa. P. I–XVIII, 1–616, pls. 1–38
- Calkins GN (1901) The Protozoa. Columbia Press/Macmillan, New York
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 73:203–266. <https://doi.org/10.1017/s0006323198005167>
- Cavalier-Smith T, Chao EE-Y, Oates B (2004) Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont *Phalansterium*. *Eur J Protistol* 40:21–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2003.10.001>
- Cavalier-Smith T (2009) Megaphylogeny, cell body plans, adaptive zones: causes and timing of eukaryote basal radiations. *J Eukaryot Microbiol* 56:26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00373.x>
- Cavalier-Smith T, Chao EE, Lewis R (2016) 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Mol Phyl Evol* 99:275–296. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.023>
- Cole J, Anderson OR, Tekle YI, Grant J, Katz LA, Ne-

- rad T (2010) A description of a new «Amoebozoan» isolated from the American lobster, *Homarus americanus*. *J Eukaryot Microbiol* 57:40–47
- Corsaro D, Michel R, Walochnik J, Muller K-D, Greuba G (2010) *Saccamoeba lacustris*, sp. nov. (Amoebozoa : Lobosea : Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel Chlamydia ‘*Candidatus Metachlamydia lacustris*’ (Chlamydiae : Parachlamydiaceae). *Europ J Protistol* 46:86–95.
- Corsaro D, Venditti D (2013) Molecular Phylogenetics Evidence for a Novel Lineage of Amoebae Within Discosea (Amoebozoa: Lobosa). *Acta Protozool* 52: 309–316.
- Delage Y, Hérouard E (1896) *Traité de Zoologie Concrète*. Vol. 1: La Cellule et les Protozoaires. Paris: Schleicher Frères, 584 p
- Dykova I, Bohacova L, Fiala I, Machackova B, Peckova H, Dvorakova H (2005) Amoebae of the genera *Vannella* Bovee, 1965 and *Platyamoeba* Page, 1969 isolated from fish and their phylogeny inferred from SSU rRNA gene and ITS sequences. *Europ J Protistol* 41:219–230
- Dykova I, Kostka M, Peckova H (2008) Morphology and SSU rDNA-based Phylogeny of a New Strain of *Saccamoeba* sp. (*Saccamoeba* Frenzel, 1892, Amoebozoa). *Acta Protozoologica* 47(4):397–405
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549 <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lahr DJG, Grant JR, Katz LA (2013) Multigene phylogenetic reconstruction of the Tubulinea (Amoebozoa) corroborates four of the six major lineages, while additionally revealing that shell composition does not predict phylogeny in the Arcellinida. *Protist* 164(3):323–339. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.02.003>
- Lahr DJ, Grant J, Molestina R, Katz LA, Anderson OR (2015) *Sapocribrum chincoteaguense* n. gen. n. sp.: A small, scale-bearing amoebozoan with flabellinid affinities. *J Eukaryot Microbiol* 4:444–453. <https://doi.org/10.1111/jeu.12199>
- Leidy J (1879) Freshwater rhizopods of North America. United States Geological Survey of the Territories Report 12:1–324
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71:491–499
- Mrva M (2010/11) Morphological studies on two rare soil amoebae *Deuteramoeba algonquinensis* and *D. mycophaga* (Gymnamoebia, Amoebidae). *Protist* 6:284–289
- Page FC (1983) *Marine Gymnamoebae*. Cambridge : Institute Terrestre Ecology
- Page FC, Robson EA (1983) Fine structure and taxonomic position of *Hydramoeba hydroxena* (Entz, 1912). *Protistologica* 19:41–50
- Page FC (1988) *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK, 122 p
- Page FC, Siemensma FJ (1991) *Nackte Rhizopoda und Heliozoa (Protozoenfauna Band 2)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 3–170 p
- Pawlowski J, Burki F (2009) Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *J Eukaryot Microbiol* 56:16–25. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00379.x>
- Peglar MT, Amaral Zettler LA, Anderson OR, Nerad TA, Gillevet PM, Mullen TE, Frasca JrS, Silberman JD, O’Kelly CJ, Sogin ML (2003) Two new small-subunit ribosomal RNA gene lineages within the subclass Gymnamoebia. *J Eukaryot Microbiol* 50: 224–232. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00122.x>
- Penard E (2018) *Faune Rhizopodique du bassin du Léman*. Henry Kundig. Geneve, 1902.
- Sims GP, Rogerson A, Aitken R (1999) Primary and Secondary Structure of the Small-Subunit Ribosomal RNA of the Naked, Marine Amoeba *Vannella anglica*: Phylogenetic Implications. *J Mol Evol* 48:740–749. <https://doi.org/10.1007/pl00006518>
- Tekle YI, Grant J, Anderson OR, Nerad TA, Cole JC, Patterson DJ, Katz LA (2008) Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within ‘Amoebozoa’ upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. *Mol Phylogenet Evol* 47:339–352. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.015>
- Willumsen NBS (1982) *Chaos zoochlorellae* sp. nov. (Gymnamoebia, Amoebidae) from a Danish freshwater pond. *J Nat Hist* 16:803–813

Надійшла в редакцію 23.01.23
Після доопрацювання 25.05.23
Прийнята до друку 18.11.23