

УДК 576.893.161.13.+577.21

**КЛАССИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ТРИПАНОЗОМАТИД НАСЕКОМЫХ:
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛИЗА ИЗОФЕРМЕНТОВ**

© С. А. Подлипаев, Т. А. Рокицкая

В статье представлены результаты исследования 22 культур трипанозоматид из насекомых с использованием мультилокусного электрофореза 10 ферментных систем. Показано, что трипанозоматиды имеют чрезвычайно широкую специфичность к хозяевам и не демонстрируют зависимости от места выделения культуры. Показана реальность рода *Wallaceina* и искусственность родов *Crithidia*, *Herpetomonas* и *Leptomonas*. Имеется хорошее соответствие между результатами анализа изоферментов, исследованием генома с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами и изучением кинетопластной ДНК. Для адекватного представления разнообразия трипанозоматид количество имеющихся родов недостаточно. Совпадение данных, полученных при применении различных методов, и наличие выраженной кластеризации на полученных дендрограммах позволяют использовать традиционные таксономические категории для классификации трипанозоматид насекомых и говорить о применении традиционной концепции вида для этих организмов.

В последние годы резко повысился интерес к трипанозоматидам насекомых и растений. Первые привлекают внимание и как модельные объекты, достаточно легко культивируемые в лаборатории, и как паразиты, исследование которых необходимо для понимания эволюции трипанозоматид вообще. Вторые — как возбудители опаснейших заболеваний культурных растений, вызывающие катастрофические потери урожаев, и как свидетельство уникальной эволюционной экспансии трипанозоматид, освоивших в качестве хозяев и животных, и растения (Dollet, 1984; Podlipaev, 1996; Vickerman, 1994). Исследования трипанозоматид насекомых приобретают особенный интерес, так как именно среди них следует искать возможных предков трипанозоматид растений.

Клетка трипанозоматид весьма бедна информативными морфологическими признаками (Подлипаев, Лобанов, 1996). Система, основанная на использовании таких признаков, весьма несовершенна, что делает применение молекулярно-биологических критериев не только оправданным, но и необходимым (Подлипаев и др., 1998).

Возрождающиеся в последнее время представления о клональной организации популяций паразитических простейших вообще и трипанозоматид в частности и дискуссия о неприменимости к таким организмам традиционных таксономических категорий (Tibaogenc e. a., 1990) делают исследования этих паразитов особенно актуальными и с точки зрения таксономии.

Систематика трипанозоматид насекомых весьма далека от совершенства, количество имеющихся родов явно недостаточно для адекватного отображения имеющегося разнообразия этих простейших (Подлипаев и др., 1998). Уровень специфичности трипанозоматид насекомых к своим хозяевам оставался неопределенным в течение долгого времени. При исследовании ДНК этих паразитов была продемонстрирована их чрезвычайно широкая специфичность (Подлипаев и др., 1998).

Исследования изоферментов предпринимались в основном для патогенных представителей трипанозоматид, а также для трипанозоматид растений (Muller e. a., 1994). Трипанозоматиды насекомых изучались с применением этого метода значительно меньше, причем дендрограммы сходства не строились, кроме тех случаев, когда единичные изоляты из насекомых использовались для сравнения с культурами из растений (Muller e. a., 1997).

В настоящем исследовании впервые предпринята попытка изучить спектры изоферментов у значительного количества изолятов из насекомых.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использовались культуры, выделенные из насекомых на Северо-Западе России по единой методике (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987). Эта коллекция культур является одной из самых больших и разносторонне охарактеризованных региональных коллекций трипанозоматид насекомых. Именно на этом материале было проведено исследование кинетопластной ДНК (Kolesnikov e. a., 1990) и электрофоретических спектров ДНК, амплифицированной с универсальным праймером (Подлипаев и др., 1998). В анализ включены также культуры трипанозоматид, традиционно использующиеся в исследованиях других лабораторий (см. таблицу).

В анализ включены изоляты, выделенные: из одного вида хозяина в одном и том же месте (культуры 14—16); из одного хозяина — в разных пунктах

Культуры трипанозоматид насекомых, использованные в работе*
Trypanosomatid stock origins

Вид (изолят)	Насекомое-хозяин	Источник культур
Отряд Mecoptera		
<i>Leptomonas</i> sp.? P (1)	<i>Panorpa communis</i>	Выделена в Ленинградской обл. в 1988 г.
Отряд Diptera		
<i>Crithidia fasciculata</i> Le-ger, 1902 (2)	?	Получена от д. б. н. А. А. Колесникова, МГУ
<i>Crithidia guilhermei</i> Soares, Brazil, Tanuri et Souza, 1986 (3)	<i>Phaenicia cuprina</i>	Получена от Dr. E. P. Camargo, San Paulo University, Бразилия, выделена в Бразилии
<i>Crithidia lucilia</i> (Strickland, 1911) (4)	?	Получена от д. б. н. А. А. Колесникова, МГУ
<i>Herpetomonas megaseliae</i> Daggett, Dollahon et Janovy, 1972 (5)	<i>Megaselia scalaris</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США
<i>Herpetomonas muscarum</i> (Leidy, 1856) (6)	<i>Musca domestica</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США
Отряд Hemiptera		
<i>Crithidia acanthocephali</i> Hanson et McGhee, 1961 (7)	<i>Acanthocephala femorata</i>	Получена от Dr. E. P. Camargo, San Paulo University, Бразилия
<i>Herpetomonas pessoai</i> ** (Galvao e. a., 1970) (8)	<i>Zelus leucogrammus</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США

Продолжение таблицы

Вид (изолят)	Насекомое-хозяин	Источник культур
<i>Leptomonas collosoma</i> Wallace e. a., 1960 (9)	<i>Gerris dissortis</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США Выделена в США
<i>Leptomonas samueli</i> Carvalho, 1973 (10)	<i>Zelus leucogrammus</i>	Получена от Dr. E. P. Camargo, San Paulo University, Бразилия Выделена в Бразилии
<i>Leptomonas seymouri</i> Wallace, 1977 (11)	<i>Dysdercus suturellus</i>	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США Выделена в США
<i>Leptomonas</i> sp. Cfm. (12)	<i>Nabicala flavomarginata</i>	Выделена в Псковской обл. в 1983 г.
<i>Leptomonas</i> sp. D4 (13)	» »	Выделена в Ленинградской обл. в 1982 г.
<i>Leptomonas</i> sp.? F2 (14)	» »	Выделена на мысе Картеш, Белое море в 1986 г.
<i>Leptomonas</i> sp.? F5 (15)	» »	Тот же
<i>Leptomonas</i> sp.? F8 (16)	» »	» »
<i>Leptomonas</i> sp.? CL6 (17)	<i>Nabicala limbata</i>	Выделена в Псковской обл. в 1983 г.
<i>Leptomonas</i> sp.? CL8 (18)	<i>Nabicala limbata</i>	Выделена в Ленинградской обл. в 1984 г.
<i>Leptomonas</i> sp.? NV (19)	» »	Тот же, 1982 г.
<i>Leptomonas</i> sp. (20)	?	Получена от Dr. D. Maslov, University of California-Riverside, США
<i>Blastocrithidia miridarum</i> Podlipaev et Frolov, 1978 (21)	<i>Lygocoris lucorum</i>	Выделена в Псковской обл. в 1984 г.
<i>Wallaceina inconstans</i> Podlipaev e. a., 1990 (22)	<i>Calocoris sexguttatus</i>	Выделена в Псковской обл. в 1986 г.

Примечание. * Номера культур (1—22) в таблице соответствуют номерам на рисунке. «?» — невозможность уверенного отнесения изолята к данному роду на основании морфологических признаков. ** *Herpetomonas pessoai* (Galvao, Oliveira, Carvalho et Veiga, 1970) во многих публикациях обозначается как *Herpetomonas samuelpessoai* Roitman, Brener, Roitman et Kitajima, 1976, что является некорректным, с точки зрения зоологической номенклатуры (Levine, 1978; Подлипаев, 1990).

(изоляты 12—16); из двух видов одного рода полужесткокрылых — в одной точке (13 и 18, 19 и 12, 17) и в разных местах (12 и 18, 13 и 17); из хозяев, принадлежащих к различным родам одного семейства — в одном пункте (культуры 21 и 22); из представителей разных семейств клопов, собранных в одном районе (12 и 21, 22); и наконец, из насекомых относящихся к разным отрядам — в одном районе (1 и 18, 19) (см. таблицу). Такой подбор материала позволяет установить степень приуроченности трипанозоматид к определенной таксономической категории хозяев и району выделения изолятов.

Использовалась 5-дневная культура трипанозоматид на среде ВНИ (Brain Heart Infusion, DIFCO) с добавлением гемина (10 мкг/мл), клетки осаждали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 3 мин, дважды промывали свежей средой и осаждали при тех же условиях.

Клетки разрушались замораживанием—оттаиванием. Условия проведения электрофорезов и методы выявления зон ферментативной активности основывались на классических методиках (Серов и др., 1977). 10 ферментных систем были использованы: глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (E.C.1.1.1.49., G6PDH); изоцитратдегидрогеназа (E.C.1.1.1.42., ICD); малик энзим (E.C.1.1.1.40., ME); малатдегидрогеназа (E.C.1.1.1.37., MDH); глюкозофосфатизомераза (E.C.5.3.1.9., GPI); пептидаза 1 (E.C.3.4.11—13, Pep1); пептидаза 2 (E.C.3.4.11—13, Pep2); 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (E.C.1.1.1.43, 6PGD); нуклеозидаза (E.C.3.2.2.1, NH); фосфоглюкомутаза (E.C.2.7.5.1., PGM). Не менее трех повторностей электрофореза проводились в 7.5 %-ном полиакриламидном геле.

Так как аллельная интерпретация представляет известные трудности, особенно на мало исследованных объектах, было использовано неаллельное чтение фореграмм: каждая отчетливая и воспроизводимая полоса считалась определенным генотипом, аллельная структура которого оставалась неизвестной.

Отношения между исследованными культурами были построены с использованием коэффициента

$$D_{ij} = 1 - \frac{C}{N_i + N_j - C} \text{ (Jaccard's distance),}$$

где C — число полос, общих между культурами i и j , N_i и N_j — общее число полос для культур i и j соответственно. Average Linkage Method (Nearest Neighbour) был использован для построения суммарной дендрограммы по всем использованным ферментам.

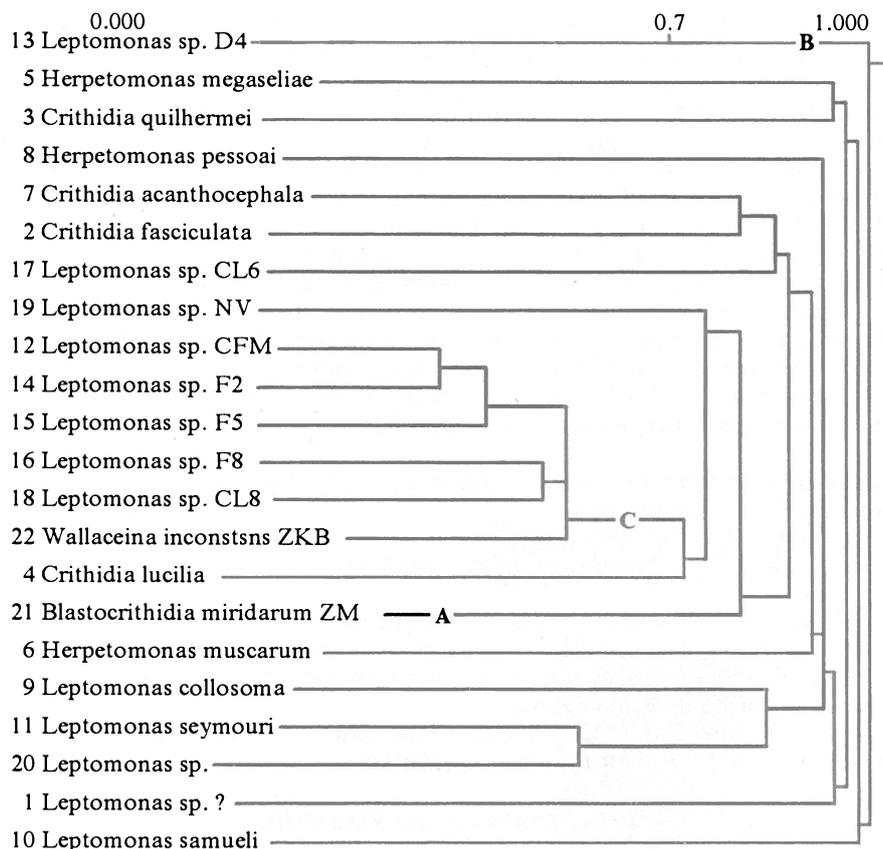
Уровень различий 0.7 принимался как максимальный для возможности обсуждения достоверности кластеров (Muller e. a., 1994).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показывают, что большинство исследованных культур достаточно гетерогенно по профилям изоферментов, что выражено в значительных дистанциях на дендрограмме (см. рисунок).

Часть изолятов из *Nabidula flavomarginata* (сем. Nabidae) образует вполне достоверный кластер (культуры 12, 14—16), однако к нему относятся и изоляты 18 — из *Nabidula limbata* и 22 — *Wallaceina inconstans*¹, выделенный из клопов сем. Miridae. С другой стороны, изолят 13 — *Leptomonas* sp. D4 из *Nabidula flavomarginata* расположен на очень большом расстоянии от указанного кластера (см. рисунок). Вопрос о родственности изолятов из этого хозяина требует дополнительного изучения, однако уже сейчас можно сказать, что строгой приуроченности трипанозоматид к виду хозяина обнаружить не удалось так же, как и к роду *Nabidula* (изоляты 12, 13, 17—19). На значительном расстоянии друг от друга находятся и изоляты, полученные из клопа *Zelus leucogrammus* в Бразилии (8, 10). Не образуют кластеров и культуры, выделенные из разных родов одного семейства (культуры 21, 22), а также и из разных семейств отряда полужесткокрылых (например, 12 и 21, 22). Изоляты, выделенные из двукрылых, тоже не являются родственниками (культуры 3, 4, 6). Таким образом, мы можем заключить, что трипанозоматиды насекомых не проявляют строгой специфичности к своим хозяевам.

¹ Мы используем родовое название *Wallaceina* Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1999 как замещающее имя для *Proteomonas* Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990 (Подлипаев и др., 1990), так как название *Proteomonas* было преоккупировано для криптонадного жгутиконосца (*Proteomonas* Hill et Wetherbee, 1986). Замещающее имя дано в честь Ф. Уоллеса (F. G. Wallace).



Дендрограмма различий исследованных изолятов (построена по результатам анализа 10 изоферментных систем).

Номера на дендрограмме (1—22) соответствуют номерам изолятов в таблице. А—С — группы изолятов по размеру миниколеца кинетопластной ДНК (Kolesnikov e. a., 1990). Наверху — шкала различий.

Также не просматривается приуроченности и к месту выделения, за исключением изолятов, выделенных из *Nabacula flavomarginata* на Белом море (культуры 14—16), однако следует отметить, что каждая из этих культур образует субкластер с какой-нибудь другой культурой, отличающейся или местом выделения, или хозяином (см. рисунок, таблицу).

Полученные данные в целом соответствуют данным о специфичности, полученным при анализе генома трипанозоматид насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР), однако последний метод более категорично продемонстрировал крайне широкую специфичность трипанозоматид насекомых даже на уровне отрядов последних (Подлипаев и др., 1998). Вообще мультилокусный электрофорез изоферментов, вероятно, является менее чувствительным методом (по сравнению с УП-ПЦР) при выявлении различий между близкородственными изолятами, что можно заключить и по результатам исследования трипанозоматид растений (Muller e. a., 1997).

Часть исследованных представителей рода *Leptomonas* образует достоверный кластер (изоляты 11 — *Leptomonas seymouri* и 20 — *Leptomonas* sp. и родственный им изолят 9 — *L. collosoma*); в то время как другие располага-

ются на значительном расстоянии от него (культуры 10 — *L. samueli* и 17 — *Leptomonas* sp. CL6). Эти данные соответствуют полученным с помощью УП-ПЦР и подтверждают представления о гетерогенности и искусственности рода *Leptomonas*, который, бесспорно, должен быть разделен на несколько отдельных родов (Подлипаев и др., 1998; Camargo e. a., 1992).

Также гетерогенным представляется и род *Crithidia*, два исследованных представителя которого располагаются не столь далеко друг от друга, хотя и не образуют достоверного кластера (культуры 2 — *Crithidia fasciculata* из Diptera и 7 — *C. acanthocephali* из Hemiptera), а другие изученные критидии (изоляты 3 — *C. quilhermei* и 4 — *C. lucilia*) отстоят далеко от этих видов. Род *Herpetomonas* тоже демонстрирует значительную гетерогенность (культуры 5 — *Herpetomonas megaseliae* и 6 — *H. muscarum*). Без сомнения и роды *Crithidia* и *Herpetomonas* следует считать искусственными.

Заслуживает внимание наиболее достоверный и объемный кластер на дендрограмме, объединяющий культуры неясной родовой принадлежности (12, 14—16, 18 и изолят 22 — *Wallaceina inconstans*). По морфологическим данным 5 первых трудно отнести к какому-нибудь из 3 родов — *Crithidia*, *Leptomonas* или *Wallaceina*. При выделении они были условно отнесены к роду *Leptomonas*, как имеющему минимум характерных особенностей. Объединение их в один кластер с представителем рода *Wallaceina* заставляет пересмотреть их систематическое положение, для чего проводятся дополнительные морфологические исследования, предварительные данные которых свидетельствуют о принадлежности или близости этих изолятов к роду *Wallaceina*. Весьма интересно, что сходные результаты были получены и при применении УП-ПЦР, показавшей необходимость отнесения к роду *Wallaceina* нескольких изолятов, систематическое положение которых было не определено или которые первоначально были отнесены к другому роду (Подлипаев и др., 1998). Данные настоящего исследования вместе с результатами по структуре генома, выявляемой с помощью УП-ПЦР, заставляют существенно расширить границы рода *Wallaceina*.

В течение долгого времени единственным молекулярным критерием, претендовавшим на роль группового признака (например, родового), был размер миниколец кинетопластной ДНК, изученный и на использовавшейся в настоящей работе коллекции изолятов (Kolesnikov e. a., 1990), что предоставляет нам редкую возможность сравнить эти данные с результатами исследования изоферментов. Следующие культуры использовались в обеих работах: 13, 19—22. Кинетопластная ДНК исследовалась у трех культур с Белого моря (F3, F6, F9), выделенных в то же время, в той же точке и из того же хозяина, что и культуры 14—16, обсуждаемые в настоящей работе и образующие самостоятельный кластер (см. рисунок). Размер миниколец в этой группе и у изолята 22 — *Wallaceina inconstans* 1.55 тыс. пар нуклеотидов (группа С по: Kolesnikov e. a., 1990; см. рисунок). Таким образом, родственные отношения изолятов, образующих кластер рода *Wallaceina*, подтверждаются и единым размером миниколец кинетопластной ДНК.

Изолят 21 — *Blastocrithidia miridarum*, относящийся к малочисленной группе А по размеру миниколец, занимает и достаточно обособленное положение на дендрограмме (см. рисунок). Еще более далек от других культур изолят 13 — *Leptomonas* sp. D4, представляющий группу В по миникольцам (Kolesnikov e. a., 1990).

Таким образом, мы вправе заключить, что имеется определенное соответствие между положением изолятов на приводимой в данной работе дендрограмме и размером миниколец их кинетопластной ДНК. Это позволяет утверждать реальность существования групп изолятов, выявляемых при анализе изоферментов. Совпадение данных, полученных при применении различных методов, и наличие выраженной кластеризации на полученных дендрограм-

мах позволяют использовать традиционные таксономические категории для классификации трипанозоматид насекомых и говорить (несмотря на очевидно высокий уровень клональной изоляции) о применении традиционной концепции вида для этих организмов.

Представленное исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 95—04—11 837, 96—04—48 124, 99—04—49 572).

Список литературы

- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипанозоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Жизненные циклы простейших. Л., 1985. С. 35—47 (Тр. ЗИН АН СССР. Т. 129).
- Подлипаев С. А. Каталог мировой фауны простейших семейства Trypanosomatidae // Тр. ЗИН РАН. 1990. Т. 217. 177 с.
- Подлипаев С. А., Лобанов А. Л. Использование размерных признаков для дифференциации низших трипанозоматид // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 4. С. 324—332.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545—552.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 4. С. 339—345.
- Подлипаев С. А., Мокроусов И. В., Булат С. А. К молекулярной геносистематике трипанозоматид из насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 4. С. 317—326.
- Серов О. Л., Корочкин Л. И., Манченко Г. П. Электрофоретические методы исследования изоферментов // Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. С. 18—79.
- Camargo E. P., Sbravate C., Teixeira M. M. G., Uliana S. R. B., Soares M. B. M., Affonso H. T., Floeter-Winter L. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids // J. Parasitol. 1992. Vol. 78. P. 40—48.
- Dollet M. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*) // Ann. Rev. Phytopathol. 1984. Vol. 22. P. 115—132.
- Kolesnikov A. A., Maslov D. A., Podlipaev S. A. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR // Arch. Protistenkd. 1990. Bd 138. S. 239—250.
- Levine N. D. Nomenclature of *Herpetomonas pessoai* // J. Parasitol. 1978. Vol. 64. P. 668.
- Muller E., Gargani D., Shaeffer V., Stevens J., Fernanders-Beserra C., Sanchez-Moreno M., Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops // European J. Plant Pathology. 1994. Vol. 100. P. 425—434.
- Muller E., Gargani D., Banuls A. L., Tibayrenc M., Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis // Parasitology. 1997. Vol. 115. P. 403—409.
- Podlipaev S. A. Phytoflagellates (Trypanosomatidae: Mastigophora): the pathogenicity of new plant diseases and their potential as biological control agents // Proc. IX Intern. Symp. Biol. Control of Weeds. University of Cape Town, 1996. P. 337.
- Tibayrenc M., Kjellberg F., Ayala F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmo-*

dium, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 2414—2418.
Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates // Int. Journ. Parasitology. 1994. Vol. 24, N 8. P. 1317—1331.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034;
Институт общей генетики РАН, Москва, 117809

Поступила 29.12.1997

CLASSIFICATION OF ISOLATES OF INSECT'S TRYPANOSOMATIDS: ISOENZYME ANALYSIS

S. A. Podlipaev, T. A. Rokitskaya

Key words: insect's trypanosomatids, taxonomy, multilocus enzyme electrophoresis.

SUMMARY

The paper deals with the results of examination of 22 cultures of trypanosomatids from insects by the multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). 10 isoenzyme systems were studied. Dendrogram derived from genetic distances is obtained. The results allow to confirm that the insects trypanosomatids have very low level of host specificity and do not demonstrate the dependence upon the place of culture isolation. The reality of genus *Wallaceina* was demonstrated. The genera *Crithidia*, *Herpetomonas* and *Leptomonas* were shown to be an artificial group. There is a good correspondance between the results obtained by MLEE, genome studying obtained by polymerase chain reaction with universal primers and kineoplast DNA examination. The number of Trypanosomatid genera is not enough to reflect adequately the biodiversity of the group. The coincidence of data obtained by different methods as well as the presence of obvious clusters on the dendrograms allow to apply the classic taxonomic categories for classification of insects Trypanosomatids.