

УДК 576.893.19 : 595.754

**ПРОБЛЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР ГОМОКСЕННЫХ  
ТРИПАНОСОМАТИД И ОПИСАНИЕ НОВОГО ВИДА WALLACEINA  
PODLIPAЕVI SP. N. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**

© М. Н. Малышева, А. О. Фролов

Зоологический институт РАН  
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034  
E-mail: malmarnik@yandex.ru  
Поступила 13.01.2009

Методами световой и электронной микроскопии была изучена типовая культура трипаносоматид *Leptomonas peterhoffi* Podlipaev, 1985 (штамм П-101) и переисследован гапантотип *L. peterhoffi* Podlipaev, 1985 (препарат № 101). Доказано, что первоописание *L. peterhoffi* было сделано на неоднородном материале, поскольку клоп-хозяин был заражен несколькими видами гомоксенных трипаносоматид. При изоляции типового штамма П-101 в культуру были выделены жгутиконосцы, относящиеся к роду *Wallaceina*. На основании анализа морфологии клеток трипаносоматид на препарате гапантотипа *L. peterhoffi* Podlipaev, 1985 и переисследования штамма П-101 описан новый вид гомоксенных трипаносоматид *Wallaceina podlipaevi*.

Гомоксенные трипаносоматиды — паразиты насекомых стали в последние десятилетия популярным объектом исследования молекулярных биологов, о чем свидетельствует большое количество работ, выполненных на этих простейших (Подлипаев и др., 1998; Bulat et al., 1999; Merzlyak et al., 2001a, b; Podlipaev et al., 2004; Yurchenko et al., 2006a, b; Костыгов, Фролов, 2007). Такая «популярность» гомоксенных трипаносоматид связана с их доступностью (практически всесветное распространение) и относительной легкостью получения культур на аксеничных питательных средах. Молекулярно-биологические исследования внесли существенный вклад в изучение трипаносоматид. Вместе с тем в литературе имеется множество примеров несоответствия молекулярно-филогенетических построений и филогенетических схем, полученных на основании сравнительно-морфологических исследований (Подлипаев и др., 1998; Bulat et al., 1999; Подлипаев, Фролов, 2000; Maslov et al., 2001; Merzlyak et al., 2001a, b; Костыгов, Фролов, 2007). Такие противоречия могут быть обусловлены в частности тем, что многие лабораторные культуры до сих пор не достаточно хорошо изучены на морфологическом уровне, а определение многих из них было выполнено только при их первоописании с использованием лишь световой микроскопии. В некоторых случаях не удается установить даже происхождение культур.

Ярким примером тому может служить одна из самых старых и популярных культур — *Crithidia oncopelti* (Noguchi, Tilden, 1926; Крылов и др., 1985). Ногучи и Тилден (Noguchi, Tilden, 1926) выделили 3 изолята трипаносоматид из клопов *Oncopeltus fasciatus* и *Lygaeus kalmii* (штат Нью-Йорк), и из *Oncopeltus* sp. (Перу), а также 2 изолята из растений *Asclepias syriaca* (Нью-Йорк) и *Asclepias nivea* (Гондурас). По морфологии клеток в культуре авторы пришли к выводу, что все изоляты относятся к одному виду, названному ими *Herpetomonas oncopelti*. Два изолята находятся в Американской коллекции типовых культур (АТСС 12982 и 30264) и несколько культур с неясной историей, обозначенные как *Crithidia oncopelti*, содержатся в разных лабораториях мира. В настоящее время не представляется возможным установить из какого именно хозяина (насекомого или растения) происходят эти культуры (Крылов и др., 1985).

Жгутиконосец *Leptomonas peterhoffi* Podlipaev, 1985 (типовая культура П-101), при его первоописании был отнесен к роду *Leptomonas* на основании обнаружения промастиготных форм трипаносоматид в пищеварительной системе клопа-хозяина *Nabidula flavomarginata* (Подлипаев, 1985). В дальнейшем выяснилось, что в культуре этого вида кроме промастигот имеются клетки с варьирующей позицией кинетопласта и длинным изогнутым жгутиковым карманом (Малышева, Скарлато, 1989), что формально сближало этот изолят с родом *Wallaceina*, однако типичные эндомастиготы не были обнаружены (Подлипаев, 1999; Подлипаев, Фролов, 2000). Кроме того, по данным молекулярно-биологических исследований, на УП-ПЦР дендрограмме *L. peterhoffi* формировал общую ветвь с представителями рода *Wallaceina* (Bulat et al., 1999). На этом основании было предложено выделить в пределах рода *Wallaceina* 2 подрода: *Wallaceina* с типовым видом *Wallaceina inconstans* (Podlipaev, Frolov et Kolesnikov, 1990) и *Leptomonas wallaceina* с типовым видом *Leptomonas peterhoffi* (Podlipaev, 1985) (Подлипаев, Фролов, 2000). Для того чтобы оценить целесообразность разделения рода *Wallaceina* на 2 подрода и определить родовую принадлежность трипаносоматид из штамма П-101, нами было проведено повторное исследование гапантотипа и типовой культуры жгутиконосец *L. peterhoffi* — П-101.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на типовой культуре жгутиконосец *Leptomonas peterhoffi* — штамм П-101 (Подлипаев, 1985), хранящейся в банке живых культур Лаборатории протозоологии Зоологического института РАН. Штамм П-101 был выделен из пищеварительной системы клопа *Nabidula flavomarginata* Scholtz. (Heteroptera, Nabidae) 29.07.1980 г. в Ленинградской обл. в окрестностях Старого Петергофа. Методика выделения культуры описана ранее (Подлипаев, 1985). От момента выделения и до 1998 г. жгутиконосец культивировали на среде КГДЭ с геминном (Подлипаев, 1985). В 1998 г. культура была переведена на среду ВНИ (Brain Heart Infusion) фирмы Difco с добавлением гемина (10 мкг/мл). Пересевы проводили один раз в месяц с последующей инкубацией в течение 3 сут при температуре 25 °С, после чего культуру жгутиконосец помещали в холодильник (5 °С). Для культивирования трипаносоматид на плотной питательной среде в приготовленную по стандартной методике среду ВНИ добавляли питательный агар фирмы Difco (2 %) и гемин (25 мкг/мл).

Сухие мазки из культуры фиксировали 96%-ным этанолом и затем окрашивали по Романовскому-Гимза (рН 6.8). Для изучения морфологии жгутиконосцев из кишечника хозяина был использован гапантотип—препарат № 101, хранящийся в коллекции Лаборатории протозоологии Зоологического института РАН. Были исследованы также мазки из типовой культуры П-101, выполненные через месяц после ее выделения в 1980 г. и спустя 27 лет в 2007 г. Светооптические исследования выполнены на микроскопе Leika DME. Микрофотографии получены с использованием телекамеры Panasonic 650 CCTV и системы видеозахвата Asus V3800. Клетки жгутиконосцев измеряли с использованием программы UTHSCSA Image Toole v. 2.0. Оценку статистической достоверности различий средних значений размерных характеристик в разных выборках жгутиконосцев проводили с использованием критерия t Стьюдента ( $n = 25$ ). При этом был принят уровень значимости  $P < 0.01$ .

Для изучения материала методами электронной микроскопии клетки из жидкой питательной среды осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин) и фиксировали 1.5%-ным глутаральдегидом в 0.1 М какодилатном буфере (1 ч, 0 °С). Зафиксированный осадок промывали в трех сменах 0.1 М какодилатного буфера, содержащего 5 % сахарозы (1 ч) и постфиксировали 2%-ным  $OsO_4$  (1 ч, 0 °С). После обезвоживания в серии растворов этанола возрастающей концентрации и в пропиленоксиде материал заключали в смесь аралдита с эпоном. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме ЛКВ-III, контрастировали водным раствором уранил-ацетата (1 ч) и цитратом свинца (5 мин). Срезы изучали в электронных микроскопах JEM-100С и JEM-100СХ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повторное исследование гапантотипа жгутиконосцев *Leptomonas peterhofi* (препарат № 101) показало наличие в кишечнике клопа-хозяина *Nabucula flavomarginata* ранее не выявленной смешанной инвазии. На мазке, сделанном из содержимого кишечника хозяина, обнаружено несколько морфотипов клеток, характерных для разных родов трипаносоматид: крупные (рис. 1, 1) и мелкие промастиготы (морфотип рода *Leptomonas*), эндомастиготы (морфотип рода *Wallaceina*), формы переходные от про- к эндомастиготам с варьирующим положением ядра и кинетопласта (рис. 1, 2), а также единичные (менее десятка на мазок) опистомастиготы (рис. 1, 1). Морфометрию опистомастигот (морфотип рода *Herpetomonas*) по причине их отсутствия в культуре не проводили.

Размерные характеристики клеток трипаносоматид исследованных морфотипов представлены в таблице. Длина крупных промастигот из кишечника хозяина составляет в среднем  $16.2 \pm 3.2$  мкм. Длина жгутика у таких промастигот почти вдвое превосходит длину тела —  $28.9 \pm 8$  мкм. Ядро у крупных промастигот, как правило, расположено в передней половине тела. Кинетопласт всегда находится перед ядром, диск кинетопластного нуклеоида расположен перпендикулярно к продольной оси тела жгутиконосца. Доля длинных промастигот составляет 38.2 % от общей численности жгутиконосцев в кишечнике хозяина.

Длина мелких промастигот почти вдвое меньше, чем крупных промастигот и составляет в среднем  $9.3 \pm 1.9$  мкм. Длина жгутика мелких промастигот примерно равна длине их тела —  $8.4 \pm 2.6$  мкм. Ядро у мелких прома-

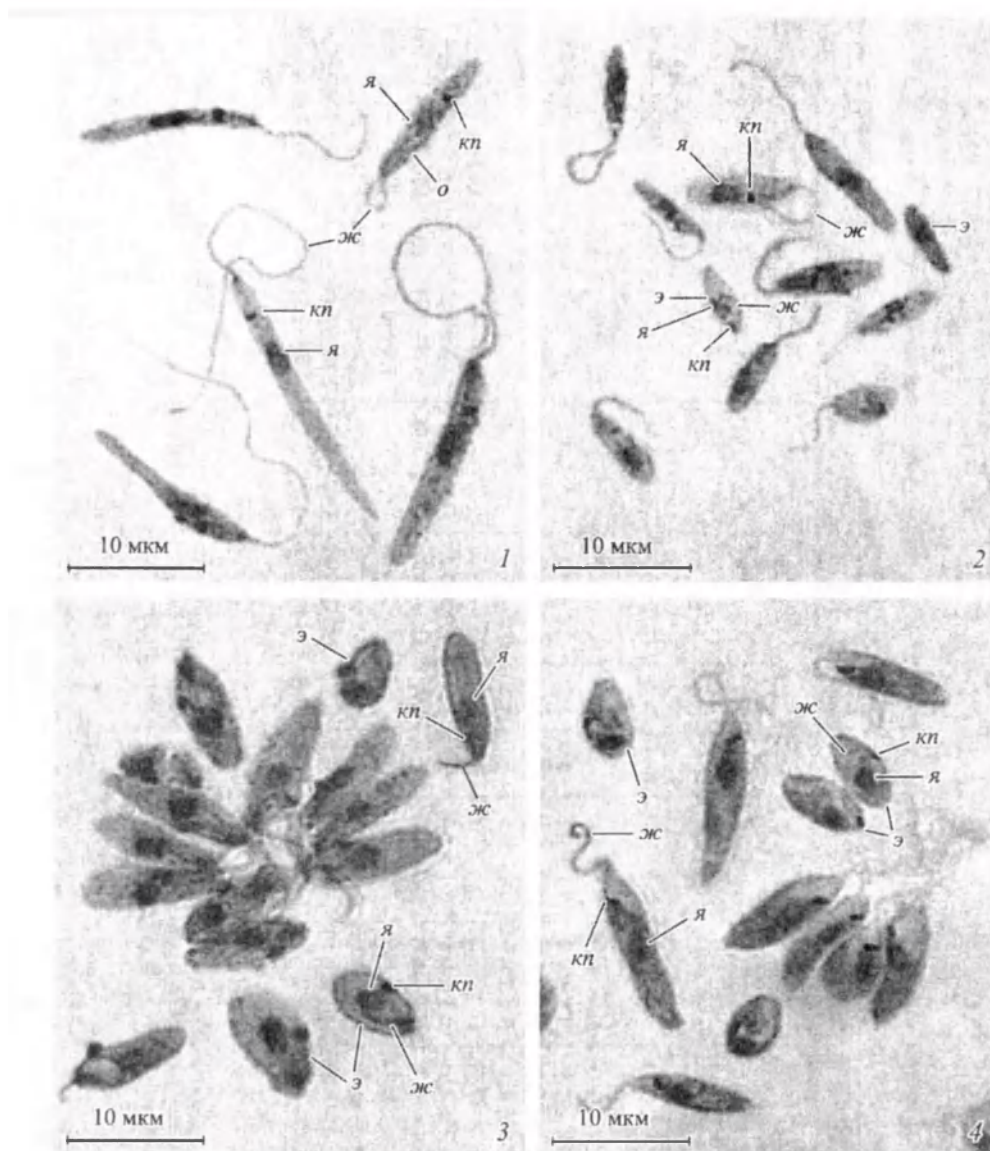


Рис. 1. Гапантотип и типовая культура *Leptomonas peterhoffi* (световой микроскоп).

1 — длинные промастиготы и опистомастиготы в кишечнике хозяина (гапантотип), 2 — короткие промастиготы и эндмастиготы в кишечнике хозяина (гипантотип), 3 — типовая культура, *L. peterhoffi* 1980 г., 4 — типовая культура *L. peterhoffi* 2007 г. ж — жгутик, кп — кинетопласт, о — опистомастигота, э — эндмастигота, я — ядро.

Fig. 1. The hapantotype and type culture of *Leptomonas peterhoffi* (light microscopy).

стигот расположено посредине тела, кинетопласт находится перед ядром. У переходных форм положение кинетопласта в клетке варьирует: он может располагаться как рядом с ядром на уровне его переднего края, так и позади ядра. Непостоянно положение кинетопласта и по отношению к продольной оси жгутиконосца — диск нуклеоида может быть расположен перпендикулярно, параллельно или под углом к ней. Доля мелких промастигот и переходных форм на мазке составляет 59.5 %.

Морфометрические параметры клеток трипаносоматид в культуре П-101 и гапантотипе — препарат № 101  
 Measurements of trypanosome cells in the culture П-101 and hapantotype — slide N 101

Морфотипы	Значения морфометрических параметров, мкм, $\bar{X} \pm s_x$								
	Дл	Шир	Пк—я	Зк—я	Пк—к	Я—к	Дл. я	Дл. к	Ж
Мелкие промастиготы в кишечнике	9.3 ± 1.9 (6.8—13.6)	1.8 ± 0.3 (1.2—2.4)	4.2 ± 0.9 (2.8—6.1)	2.8 ± 1.1 (1.1—6.0)	2.7 ± 0.7 (1.7—4.4)	1.3 ± 0.7 (0.3—2.9)	2.1 ± 0.5 (1.0—2.9)	0.9 ± 0.2 (0.6—1.2)	8.4 ± 2.6 (4.6—14.6)
Длинные промастиготы в кишечнике	16.2 ± 3.2 (9.7—24.1)	2.2 ± 0.6 (1.3—3.6)	6.5 ± 0.9 (5.0—8.6)	10.1 ± 2.5 (5.8—15.2)	3.2 ± 0.4 (2.4—4.1)	1.8 ± 0.8 (0.7—3.8)	2.5 ± 0.6 (1.5—3.5)	1.0 ± 0.2 (0.7—1.3)	28.9 ± 8.0 (13.0—40.4)
Эндомастиготы в кишечнике	5.8 ± 0.5 (5.0—6.3)	2.0 ± 0.6 (1.4—3.2)	—	—	—	—	1.7 ± 0.3 (1.3—2.1)	1.0 ± 0.2 (0.8—1.2)	о
Промастиготы в культуре 1980 г.	9.8 ± 1.5 (6.7—13.5)	3.6 ± 0.7 (2.7—5.2)	5.1 ± 0.7 (4.0—6.4)	4.9 ± 1.3 (2.3—7.3)	3.5 ± 0.8 (1.6—4.7)	0.5 ± 0.3 (0.2—1.2)	2.1 ± 0.3 (1.5—2.6)	1.1 ± 0.2 (0.9—1.5)	7.6 ± 3.3 (3.3—12.9)
Эндомастиготы в культуре 1980 г.	8.7 ± 1.5 (5.7—11.3)	3.4 ± 0.6 (2.5—4.7)	—	—	—	—	2.1 ± 0.3 (1.6—2.4)	1.1 ± 0.2 (0.8—1.5)	о
Промастиготы в культуре 2007 г.	11.4 ± 2.2 (6.4—14.9)	3.1 ± 0.6 (2.2—4.7)	5.1 ± 1.0 (3.7—7.4)	6.5 ± 1.7 (3.9—9.9)	2.2 ± 0.4 (1.5—3.0)	1.1 ± 0.6 (0.3—2.8)	2.2 ± 0.5 (1.5—3.7)	1.1 ± 0.2 (0.8—1.6)	8.3 ± 2.5 (3.9—13.3)
Эндомастиготы в культуре 2007 г.	6.4 ± 0.8 (5.2—8.2)	3.3 ± 0.5 (2.4—4.2)	—	—	—	—	1.8 ± 0.3 (1.3—2.3)	1.0 ± 0.1 (0.6—1.1)	о
Промастиготы <i>L. peterhoffi</i> в кишечнике по: Подлипаев, 1985	13.04 ± 0.06 (18.82—9.07)	2.01 ± 0.10 (2.89—1.25)	5.61 ± 0.40 (7.04—3.18)	7.10 ± 0.52 (11.77—3.09)	3.11 ± 0.13 (4.44—1.93)	2.56 ± 0.15 (3.67—1.25)	2.19 ± 0.09 (2.99—1.35)	0.8	20.11 (32.81—7.72)
Промастиготы <i>L. peterhoffi</i> в культуре по: Подлипаев, 1985	8.4	4.7	х	х	х	х	1.6	1	8.6

Примечание. В скобках указаны максимальные и минимальные значения величин. Дл. — длина, Шир. — ширина, Пк—к — расстояние от переднего конца клетки до кинетопласта, Пк—я — расстояние от переднего конца клетки до центра ядра, Зк—я — расстояние от заднего конца клетки до центра ядра, Я—к — расстояние от ядра до кинетопласта, Дл. я. — длина ядра, Дл. к. — длина кинетопласта, Ж — длина жгутика, о — параметр отсутствует, «—» — параметр не подлежит оценке, х — данные отсутствуют.

Размерные характеристики крупных и мелких промастигот, обнаруженных в кишечнике хозяина, достоверно различаются по 8 из 9 сравниваемых признаков при принятом уровне значимости  $P < 0.01$ .

Лишенные свободного жгутика эндомастиготы имеют эллипсоидальную форму тела, положение ядра и кинетопласта в клетке сильно варьирует. Ядро обычно расположено в центральной части эндомастиготы, но иногда может быть смещено к заднему концу. Кинетопласт может находиться перед ядром, рядом с ядром и позади ядра, при этом клетка принимает практически опистомастиготную организацию. Однако в отличие от настоящих опистомастигот у таких клеток отсутствует свободный жгутик. Жгутиковый карман длинный и, как правило, петлевидно огибает ядро. Средняя длина эндомастигот  $5.8 \pm 0.5$  мкм. Количество эндомастигот на мазке составляет 2.3 % от общего числа клеток.

На мазках, сделанных из типовой культуры П-101 вскоре после ее выделения из пищеварительной системы хозяина, нами были обнаружены промастиготы, эндомастиготы и формы переходные от эндо- к промастиготам (рис. 1, 3; см. таблицу). Ядро у промастигот в культуре расположено в центральной части клетки или немного смещено к ее переднему концу. Кинетопласт находится перед ядром, диск нуклеоида обычно расположен под углом к продольной оси тела жгутиконосца. Длина свободного жгутика не превышает длину тела жгутиконосца. Положение кинетопласта у переходных форм по отношению к ядру и к продольной оси тела варьирует. По морфометрическим параметрам промастиготы в культуре близки к мелким промастиготам, обнаруженным в кишечнике хозяина (см. таблицу). По таким размерным характеристикам, как длина и ширина клетки, длина жгутика и длина ядра статистически достоверных различий между короткими промастиготами в кишечнике и жгутиконосцами в культуре не выявлено (при  $P < 0.01$ ). Эндомастиготы в культуре представлены овальными клетками с хорошо заметным петлевидно уложенным внутренним жгутом. От эндомастигот из природной популяции они отличаются большей длиной и шириной тела, большими размерами ядра (рис. 1, 2, 3; см. таблицу). У эндомастигот из кишечника хозяина по сравнению с культуральными формами значительно уплотнена цитоплазма, изменена структура ядра и кинетопласта. Можно предположить, что такие различия связаны с расселительной функцией эндомастигот. *In vitro* подобные изменения у эндомастигот происходят только при их экспериментальном высушивании (Фролов, Малышева, 1992). При сравнении мазков типовой культуры П-101, выполненных в 2007 г., с мазками 1980 г. были выявлены небольшие различия в размерных характеристиках как про-, так и эндомастигот (рис. 1, 3, 4; см. таблицу). По-видимому, это связано со сменой питательных сред, используемых для культивирования (1980 г. — среда КГДЭ, 1998 г. — среда ВН1).

Сравнение морфометрических параметров клеток трипаносоматид при повторном исследовании гапантотипа № 101 с морфометрическими параметрами промастигот *L. peterhoffi*, приведенными Подлипаевым (Подлипаев, 1985), показывает, что последние представляют среднее значение между размерными характеристиками крупных и мелких промастигот и отличаются гораздо более широким размахом изменчивости (см. таблицу). Это говорит о том, что описание вида *L. peterhoffi* было выполнено на смеси двух различных морфотипов гомоксенных трипаносоматид, присутствовавших в кишечнике хозяина. На рисунке, сопровождающем описание *L. peterhoffi* (Подлипаев, 1985), изображены 2 типа промастигот, хорошо различающихся

ся по размерам, однако объяснение этому факту не дано. Наличием смешанной инвазии, вероятно, следует объяснить ранее описанное Подлипаевым (1985) значительное изменение морфологии клеток *L. peterhoffi* в результате перевода этих жгутиконосцев на искусственную питательную среду. В данном случае очевидно сказались селективные процессы, приведшие в конечном счете к тому, что в культуру был переведен только 1 из 2–3 видов трипаносоматид, обитавших в кишечнике хозяина. Присутствие каких-либо безжгутиковых форм как в кишечнике хозяина, так и в культуре при описании *L. peterhoffi* не было отмечено (Подлипаев, 1985). Как было показано выше, при повторном исследовании гапантотипа и типовой культуры нами были обнаружены эндомастиготы с петлевидно уложенным жгутом и варьирующим положением кинетопласта — морфотип, характерный для рода *Wallaceina* (Подлипаев и др., 1990; Vickerman, 2000).

Смешанные инвазии у насекомых — хозяев гомоксенных трипаносоматид не редкое явление, особенно для хищных насекомых (Wallace et al., 1960, 1965; Малышева, Фролов, 2002, 2004). Для некоторых видов хищных клопов экспериментальными методами была продемонстрирована возможность длительного переживания в них неспецифичных видов трипаносоматид, полученных ими от жертв в процессе питания (Carvalho, Deane, 1974; Фролов, 1987).

В оригинальном описании типовой культуры *L. peterhoffi* (штамм П-101) приведено описание результатов клонирования этих жгутиконосцев на плотной питательной среде (Подлипаев, 1985). По этим данным, *L. peterhoffi* формирует на плотной среде «... два больших класса: колонии правильной, полусферической формы и колонии неправильные, “амебоидные”» (цит по: Подлипаев, 1985). Утверждается также, что «правильная или неправильная форма колоний — наследственно стабильные признаки, сохраняющиеся при пересевах и являющиеся маркерными для соответствующих клонов» (Подлипаев, 1985). К сожалению, в работе отсутствуют сведения о клеточном составе колоний различной формы. Следует заметить, что наличие двух типов колоний может свидетельствовать о неоднородности популяции. При этом разные типы колоний могут быть сформированы разными стадиями жизненного цикла жгутиконосцев или даже разными видами (Крылов и др., 1985; Подлипаев и др., 1990). Для проверки обеих гипотез нами повторно были выполнены эксперименты по клонированию и субклонированию типовой культуры *L. peterhoffi* (штамм П-101) на плотной питательной среде. Результаты представлены на рис. 2. На плотной питательной среде жгутиконосцы формировали 2 типа колоний: амебоидные неправильной формы и правильные полусферические. Размеры последних колебались от 0.1 до 2 мм, а их численность составляла менее 1 %. Нам не удалось подтвердить факт наследуемости формы колоний. При субклонировании жгутиконосцев из амебоидных колоний были получены как амебоидные, так и полусферические колонии (менее 1 %). В результате субклонирования жгутиконосцев из полусферических колоний на чашках вырастали как амебоидные колонии, так и единичные полусферические колонии (менее 1 %). Клеточный состав амебоидных и полусферических колоний не различался. В обоих типах колоний присутствовали промастиготы, эндомастиготы и формы переходные от про- к эндомастиготам. При сравнении размерных характеристик разных морфотипов клеток из двух типов колоний, выполненном на клональном материале, различия также не выявлены ( $n = 25$ ,  $P < 0.01$ ). Возможно, что появление мелких полусферических колоний на плотной питательной среде обусловлено физиологическим состоянием клеток.

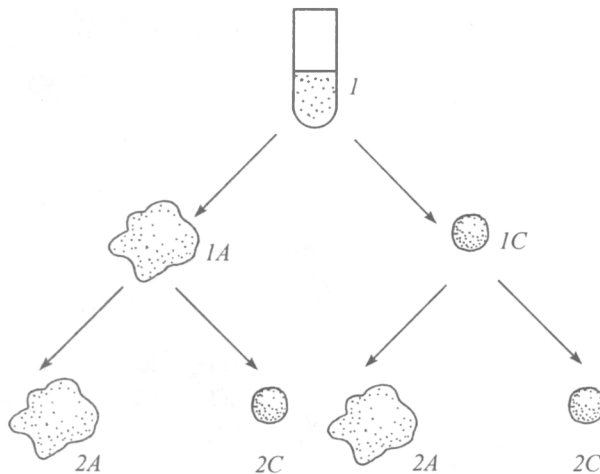


Рис. 2. Схема клонирования культуры П-101 на плотной питательной среде.

1 — культура П-101, 1А — амeboидные колонии 1-го поколения, 1С — полусферические колонии 1-го поколения, 2А — амeboидные колонии 2-го поколения, 2С — полусферические колонии 2-го поколения.

Fig. 2. The scheme of the culture's П-101 cloning on the solid culture media.

Сравнение ультратонкого строения клеток различных морфотипов из культуры.

Существенных различий в ультратонкой организации про- и эндомастигот не обнаружено. Покровы жгутиконосцев образованы тубулеммой. Клетки покрыты плазмалеммой, которую подстилает слой продольно расположенных субмембранных микротрубочек диаметром 22—24 нм (рис. 3, 1, 2). Микротрубочки расположены в свободной от рибосом зоне цитоплазмы. Расстояние между центрами соседних микротрубочек на поперечных срезах в области ядра составляет 55—60 нм. Плазмалемма формирует неглубокие складки и тонкие выросты (рис. 3, 2, 3). На поверхности плазматической мембраны расположен слабо выраженный слой неструктурированного гликокаликса (рис. 3, 2, 3).

У жгутиконосцев с промастиготной организацией жгутиковый карман прямой и короткий (рис. 3, 1). Для переходных форм от про- к эндомастиготам характерен длинный и узкий жгутиковый карман (рис. 4, 1). У клеток с эндомастиготной организацией длинный узкий жгутиковый карман петлевидно огибает ядро (рис. 3, 2). Иногда у эндомастигот жгутиковый карман мешковидно расширен. Жгутик в таком кармане уложен в виде петли (рис. 3, 3). У переходных форм и промастигот в области выхода жгутика из клетки внутрижгутиковый матрикс расширен и плотно закрывает вход в жгутиковый карман (рис. 3, 1; 4, 1, 2). Между мембранами жгутика и жгутикового кармана формируются хорошо видимые десмосомы. На поперечных срезах жгутикового кармана можно различить 2 группы микротрубочек, которые подстилают его стенки: первая представляет собой продолжение кинетосомального корешка и состоит из 4 близко друг к другу расположенных микротрубочек, вторая группа содержит на разных срезах от 5 до 8 микротрубочек глоточной группы (рис. 4, 4). Внутри жгутикового кармана в его терминальной части находится цитостом. Цитостом имеет вид неглубокой ямки, дно которой подстилает плотный войлокоподобный материал, от него берут начало микротрубочки глоточной группы (рис. 4, 1, 2). С микротрубочками тесно связаны пиноцитозные пузырьки (рис. 4, 2).



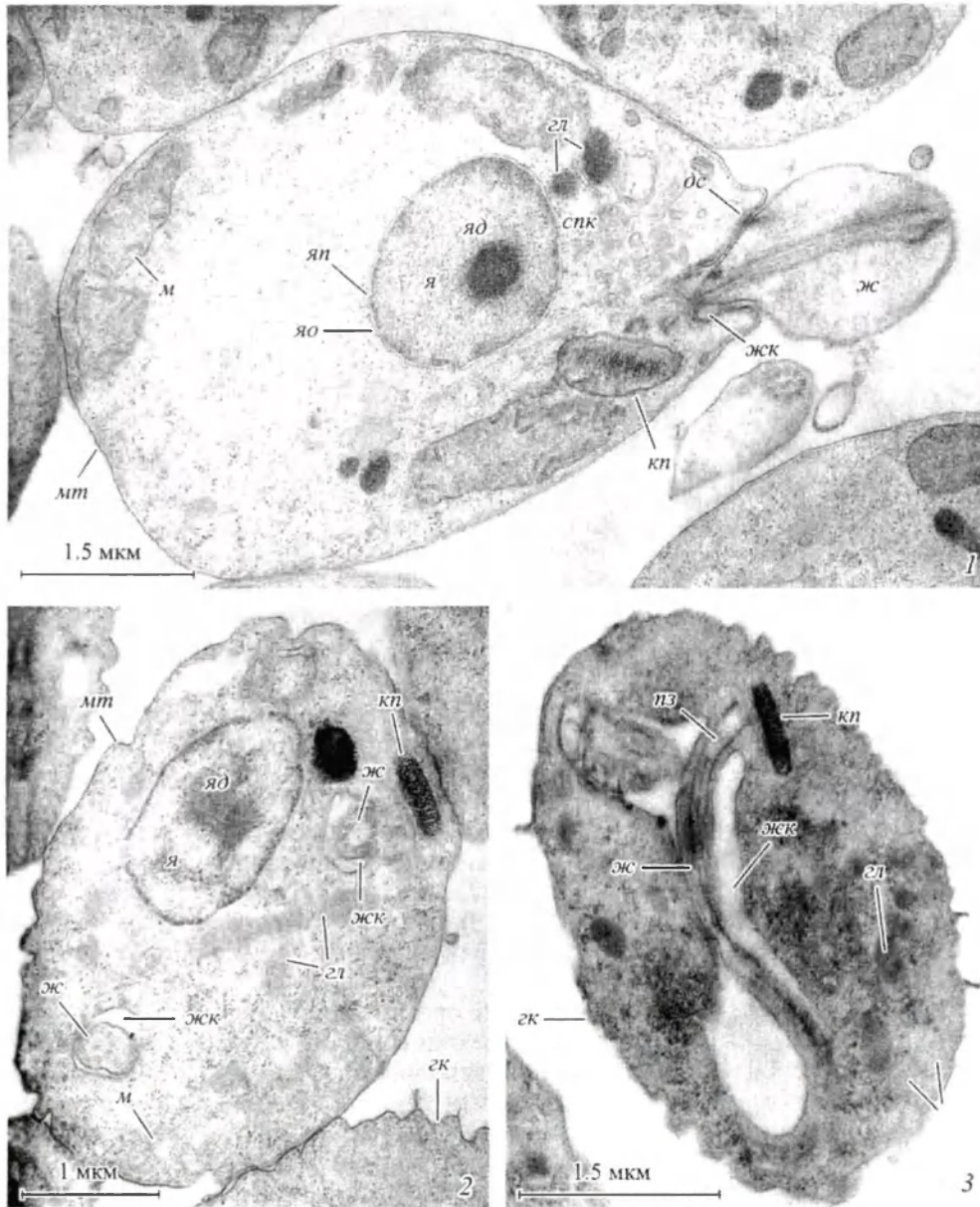


Рис. 3. Ультратонкое строение *Wallaceina podlipaevi* sp. n.

1 — продольный срез через промастиготу (общий вид), 2 — поперечный срез через эндомастиготу, 3 — продольный срез через эндомастиготу. дс — десмосома, гк — гликокаликс, гл — гликосома, жк — жгутиковый карман, л — липидные включения, м — митохондрион, мт — микротрубочки, пз — переходная зона жгутика, спк — сеть пузырьков и каналов, яд — ядрышко, яо — ядерная оболочка, яп — ядерная пора. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. The ultrastructure of *Wallaceina podlipaevi* sp. n.

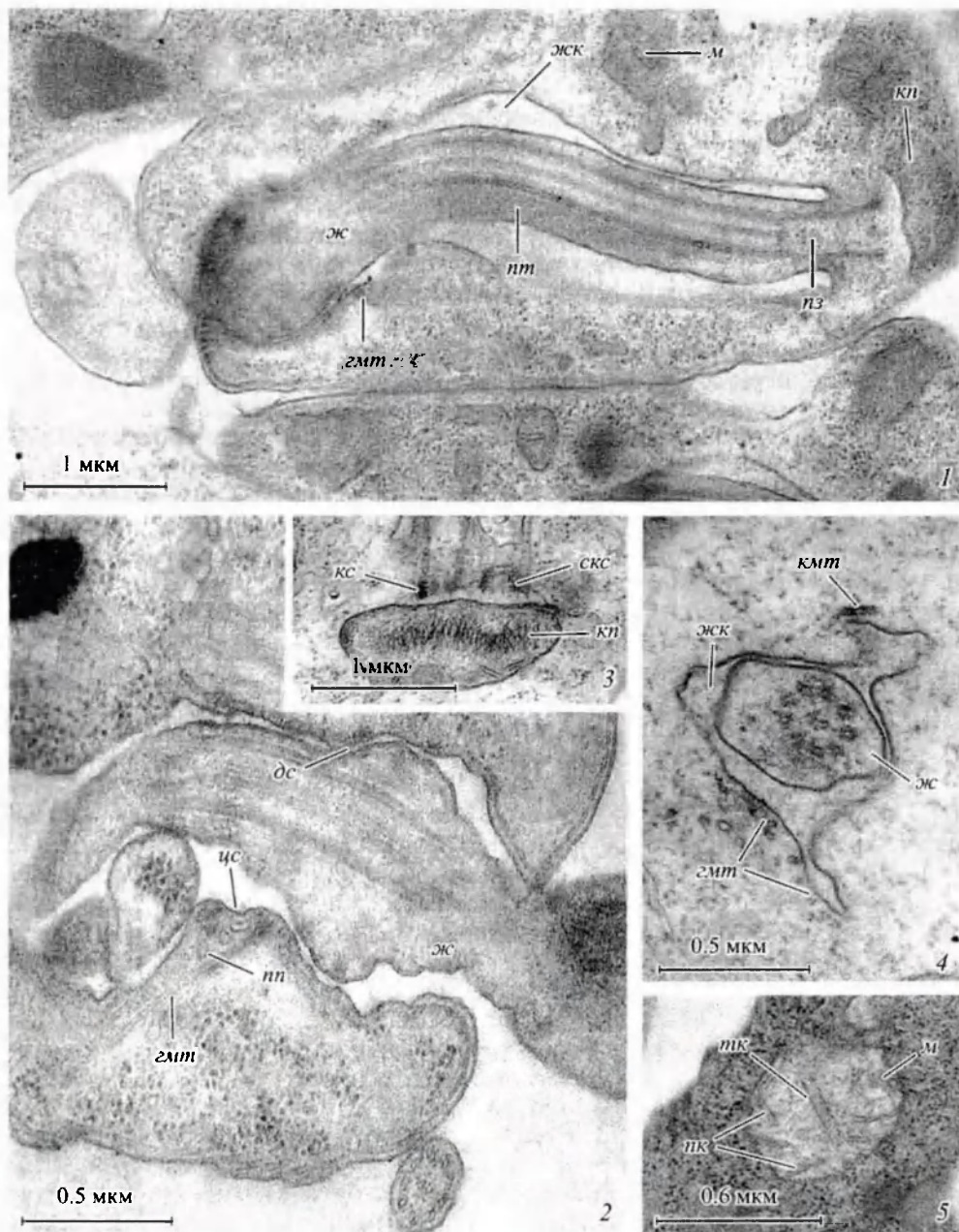


Рис. 4. Ультратонкое строение *Wallaceina podlipaevi* sp. n. (продолжение).

1 — продольный срез через жгутиковый карман, 2 — строение цитостом—цитофаренгального комплекса, 3 — продольный срез через кинетопласт, 4 — поперечный срез через жгутиковый карман, 5 — фрагмент митохондрия. ГМТ — глоточные микротрубочки, КМТ — микротрубочки кинетосомального корешка, КС — кинетосома, ПК — пластинчатые кристы, ПП — пиноцитозные пузырьки, ПП — паракисиальный тяж, СКС — сателлитная кинетосома, ТК — трубчатые кристы, ЦС — цитостом. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 3.

Fig. 4. The ultrastructure of *Wallaceina podlipaevi* sp. n.

Микротрубочки сначала отходят вглубь цитоплазмы, а потом поворачивают в сторону жгутикового кармана и подстилают его стенки. Цитофаринкс отсутствует.

Митохондрии формируют многочисленные ветви, которые расположены под тубулеммой (рис. 3, 1, 2). Кристы в митохондриях пластинчатого и трубчатого типов, с преобладанием первого (рис. 4, 5). Кинетопласт компактный (рис. 3, 1–3; 4, 1, 3). Положение кинетопласта в клетке у переходных форм и эндомастигот варьирует. Рядом с кинетопластом расположена кинетосома жгутика. Кинетосома образована 9 триплетами микротрубочек и имеет хорошо развитый центральный элемент. Рядом с рабочей кинетосомой жгутика в неделящихся клетках расположена сателлитная кинетосома (рис. 4, 3). Длина переходной зоны жгутика около 360 нм. Более чем на 2/3 своей длины переходная зона выступает над уровнем дна жгутикового кармана, только ее основание погружено в цитоплазму клетки (рис. 3, 3; 4, 1). Жгутик типичного строения с аксонемой 9 + 2 и параксиальным тяжем (рис. 3, 2; 4, 1, 4). Параксиальный тяж начинается на уровне терминальной структуры переходной зоны жгутика. В цитоплазме рядом со жгутиковым карманом расположены комплекс Гольджи и сеть каналов и пузырьков (рис. 3, 1). В цитоплазме сосредоточены многочисленные гликосомы и липидные включения (рис. 3, 2, 3). Интерфазное ядро округлой или овальной формы (рис. 3, 1, 2). Ядерная оболочка пронизана порами, наружный диаметр которых около 50 нм. Ядро имеет хорошо выраженное ядрышко. Основная масса хроматина сосредоточена под ядерной оболочкой.

Исследование ультратонкой организации жгутиконосцев из культуры П-101 позволило выявить некоторые характерные особенности, присущие гомоксенным трипаносоматидам рода *Wallaceina*. В частности это касается строения эндомастигот. Впервые эндомастиготы с длинным огибающим ядро жгутиковым карманом были описаны у *Wallaceina (Crithidia) brevicula* (Фролов, Малышева, 1989), а несколько позднее на основании наличия в жизненных циклах некоторых трипаносоматид этого морфотипа был описан новый род гомоксенных трипаносоматид — *Wallaceina (Proteomonas)* (Подлипаев и др., 1990; Vickerman, 2000). Наличие в типовой культуре *L. peterhoffi* жгутиконосцев с длинным узким и изогнутым жгутиковым карманом отмечалось и ранее, однако авторы не связывали этот феномен с каким-либо конкретным морфотипом (Малышева, Скарлато, 1989). Цитостом—цитофаренгеальный комплекс жгутиконосцев из типовой культуры П-101 редуцированного типа, без цитофаринкса (Frolov, Karov, 1995; Фролов, 1997). У жгутиконосцев было обнаружено 8 глоточных микротрубочек, что является характерной особенностью представителей рода *Wallaceina* (Frolov, Karov, 1995; Фролов, 1997). Строение жгутикового аппарата клеток из штамма П-101 также обнаруживает особенность, присущую роду *Wallaceina* — соотношение длины внеклеточной и погруженной в цитоплазму частей переходной зоны составляет 2 : 1 (Фролов, 1997). Диморфизм митохондриальных крист, обнаруженный у жгутиконосцев в культуре П-101, ранее был описан только у 3 видов гомоксенных трипаносоматид: *Crithidia fasciculata*, *Wallaceina brevicula* и *W. inconstans* (Brooker, 1971; Фролов, Малышева, 1989; Подлипаев и др., 1990).

Все выше приведенные факты позволяют нам признать ошибочным первоначальное определение типовой культуры П-101 и предложить описание нового вида, названного в память о С. А. Подлипаеве, впервые получившем культуру этих жгутиконосцев.

*Wallaceina podlipaevi* Malysheva et Frolov.

Хозяин: *Nabicula flavomarginata* Scholtz. (Heteroptera, Nabidae).

Локализация: кишечник.

Место обнаружения: Северо-Запад России, Ленинградская обл., Старый Петергоф.

Типы: гапанотип (препарат № 101), типовая культура (штамм П-101) хранятся в лаборатории протозоологии Зоологического института Российской Академии наук (Санкт-Петербург).

Диагноз: В кишечнике хозяина и в культуре жгутиконосцы представлены промастиготами, эндомастиготами и переходными формами от эндок промастиготам. Премастиготы веретеновидной формы с заостренным передним концом тела и закругленным задним. Ядро округлое, лежит посредине клетки. Кинетопласт расположен перед ядром и обычно вплотную приближен к нему. Длина свободной части жгута чуть меньше длины тела жгутиконосца. Длина промастигот в кишечнике хозяина 9.3 (6.8—13.6) мкм, ширина — 1.8 (1.2—2.4) мкм, длина жгута 8.4 (4.6—14.6) мкм. Эндомастиготы овальной формы с длинным петлеобразно уложенным жгутом, как правило, огибающим ядро. Длина эндомастигот — 5.8 (5.0—6.3) мкм, ширина — 2.0 (1.4—3.2) мкм. Крупные эндомастиготы с прямым жгутиковым карманом не обнаружены. Размеры клеток в культуре немного крупнее, чем в кишечнике хозяина (см. таблицу).

Дифференциальный диагноз. От всех ранее описанных видов рода *Wallaceina* отличаются более крупными размерами про- и эндомастигот как в кишечнике хозяина, так и в культуре. От *W. brevicula* и *W. inconstans* отличаются отсутствием крупных эндомастигот с прямым жгутиковым карманом.

Ранее описанный вид *Leptomonas peterhoffi* (Подлипаев, 1985), вследствие невозможности его повторной реизоляции из природы и переисследования, мы предлагаем рассматривать как *Leptomonas peterhoffi* species insertae sedis.

Правомерность наших выводов подтверждают и результаты ряда молекулярно-биологических исследований последнего десятилетия. Так, работы с применением метода перекрестной гибридизации ПЦР продуктов показали, что *L. peterhoffi*, *W. inconstans*, *W. brevicula*, а также *Blastocrithidia gerricola* образуют одну естественную группу (Vulat et al., 1999). Дальнейшие исследования подтвердили правильность первоначальных выводов. На филогенетическом дереве, реконструированном по методу максимального правдоподобия на основании сиквенса гена 18S рРНК, штамм П-101 образует общую кладу с двумя видами рода *Wallaceina* — *W. inconstans* и *W. brevicula*, которая локализуется в кроне (Merzlyak et al., 2001a; Костыгов, Фролов, 2007). Филогенетические построения, выполненные на основании анализа последовательности другого гена — глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, также показали, что жгутиконосцы штамма П-101 образуют общую кладу с *W. brevicula* (Yurchenko et al., 2006a, b).

Выделение внутри рода *Wallaceina* двух подродов *Wallaceina* и *Leptomonaswallaceina* (Подлипаев, Фролов, 2000) представляется нам нецелесообразным, так как отличительным признаком подрода *Leptomonaswallaceina*, по мнению авторов (Подлипаев, Фролов, 2000), являлось отсутствие типичных эндомастигот и присутствие округлых клеток с варибельным положением кинетопласта. В то же время при описании *W. inconstans*, который авторы рассматривают как типовой вид другого подрода — *Wallaceina*, были отмечены «клетки овальной формы, мелкие, с нестабильным положением кинетопласта, находящегося рядом с ядром или в задней части клетки (описто-

мастиготная организация), или жгутик делает петлю в теле клетки, в ряде случаев огибая ядро, при этом свободный жгутик может отсутствовать (эндомастиготы)» (цит. по: Подлипаев и др., 1990). То есть у *W. inconstans* присутствуют такие же «нетипичные» эндомастиготы, как и у представителей предлагаемого нового подрода *Leptomonaswallaceina*. Кроме того, как было показано выше, в типовой культуре *L. peterhoffi* штамм П-101 присутствуют настоящие эндомастиготы также как и в гапантотипе.

#### Список литературы

- Костыгов А. Ю., Фролов А. О. 2007. *Leptomonas jaculum* (Leger, 1902) Woodcock, 1914: лептомонас или бластокритидия? Паразитология. 41 (2) : 126–136.
- Крылов М. В., Подлипаев С. А., Хаецкий А. С., Белова Л. М., Фролов А. О., Ниязбекова Б. Я. 1985. Один ли вид содержится в культуре *Crithidia oncopelti* (Protozoa, Trypanosomatidae)? Зоол. журн. 64 (2) : 165–172.
- Малышева М. Н., Скарлато С. О. 1989. Исследование ультратонкой организации жгутиконосцев *Leptomonas peterhoffi*, культивируемых на жидкой и твердой питательных средах. Цитология. 31 (3) : 267–272.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. 2002. Описание и лабораторное культивирование *Leptomonas repentinus* sp. N. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразита клопа-водомерки *Gerris rufoscutellatus*. Паразитология. 36 (4) : 286–294.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. 2004. Описание *Wallaceina vicina* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) из клопа-водомерки *Gerris rufoscutellatus* Latreille, 1807 (Hemiptera: Gerridae). Паразитология. 38 (5) : 470–476.
- Подлипаев С. А. 1985. Новые виды низших трипаносоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории. Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 129 : 35–47.
- Подлипаев С. А. 1999. Трипаносоматиды насекомых и растений (фауна, систематика и биология): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб. 50 с.
- Подлипаев С. А., Мокроусов И. В., Булат С. А. 1998. К молекулярной геносистематике трипаносоматид из насекомых с помощью полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР). Паразитология. 32 (4) : 317–326.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. 1990. *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae). Паразитология. 24 (4) : 339–346.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. 2000. Филогения трипаносоматид: молекулярный и морфологический подходы. Паразитология. 34 (3) : 169–182.
- Фролов А. О. 1987. Жизненные циклы низших трипаносоматид — паразитов полужесткокрылых насекомых: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л. 19 с.
- Фролов А. О. 1997. Новая гипотеза происхождения трипаносоматид: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб. 50 с.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. 1989. Цикл развития паразитического жгутиконосца *Crithidia brevicula* (Trypanosomatidae) в лабораторной культуре. Цитология. 31 (8) : 971–975.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. 1992. Эндомастиготы — особый тип расселительных стадий трипаносоматид рода *Proteomonas*. Паразитология. 26 (4) : 351–353.
- Brooker B. E. 1971. The fine structure of *Crithidia fasciculata* with special reference to the organelles involved in the ingestion and digestion of protein. Zeitschrift fur Zellenforschung and Mikroskopische Anatomie. 116 : 532–541.
- Bulat S., Mokrousov I., Podlipaev S. 1999. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (Universally Primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. Europ. Journ. Protistol. 35 : 319–326.
- Carvalho A., Deane M. 1974. Trypanosomatids isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs. Journ. Protozool. 21 : 5–8.
- Frolov A. O., Karpov S. A. 1995. Comparative morphology of kinetoplastids. Cytology. 37 (11) : 1072–1096.

- Maslov D., Podlipaev S., Lukeš J. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96 : 397–402.
- Merzlyak E., Yurchenko V., Kolesnikov A., Alexandrov K., Podlipaev S., Maslov D. 2001a. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *Journ. Eukar. Microbiol.* 48 : 161–169.
- Merzlyak E., Zakharova M., Kolesnikov A. 2001b. Monogenetic trypanosomatids: comparison of the ND8 editing gene. *Europ. Journ. Protistol.* 37 : 233–239.
- Noguchi H., Tilden E. 1926. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants. *Journ. Exp. Med.* 44 : 303–325.
- Podlipaev S., Sturm N., Fiala I., Fernandes O., Westenberger S., Dollet M., Campbell D., Lukeš J. 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leaderRNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *Journ. Eukaryot. Microbiol.* 51 : 283–290.
- Vickerman K. 2000. Order Kinetoplastea Honigberg, 1963. In: *An illustrated Guide to the Protozoa* / Ed. by J. J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury. Allen Press. 1159–1185.
- Wallace F. G., Clark T. B., Dyer M. I., Collins T. 1960. Two new species of flagellates cultivated from insects of the genus *Gerris*. *Journ. Protozool.* 7 : 390–392.
- Wallace F. G., Todd S. R., Rogers W. 1965. Flagellate parasites of water streiders with a description of *Leptomonas costoris*, n. sp. *Journ. Protozool.* 12 (3) : 390–393.
- Yurchenko V., Lukeš J., Xu X., Maslov D. 2006a. An integrated morphological approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). *Journ. Eukaryot. Microbiol.* 53 : 1–9.
- Yurchenko V. A., Lukeš J., Jirků M., Zeldón R., Maslov D. A. 2006b. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. 133 : 537–546.

ON THE PROBLEM OF IDENTIFICATION OF HOMOXENOUS TRYPANOSOME CULTURES WITH THE DESCRIPTION OF A NEW SPECIES WALLACEINA PODLIPAEVI SP. N. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

M. N. Malysheva, A. O. Frolov

*Key words:* trypanosomes, *Leptomonas peterhoffi*, *Wallaceina podlipaevi*, type culture, light microscopy, ultrastructure.

SUMMARY

The type culture of *Leptomonas peterhoffi* Podlipaev, 1985 (stamm П-101) was examined using light and electron microscopy. The hapantotype of *L. peterhoffi* Podlipaev, 1985 was reexamined with a light microscope. As a result, a new species of homoxenous trypanosomes, *Wallaceina podlipaevi*, sp. n. was described.